# (12)特許協力条約に基づいて公開された国際出版

(19) 世界知的所有措機関 国際事務局

(43) 国際公別日 2003 年2 月13 日 (13.02.2003)

(51) 国盟特殊分图? C07K 16/46, A6IP 31/02, 35/00, 37/00, 37/06, C07K 19/00 // A6IK 38/00



# 

(10) 国際公開番号 WO 03/011911 A1

馬拉 馬本町接井3丁目1番1号小野頂品工業株 其全社 水無过数色研究所内 Osata (P),如風 欧野 (NATSIQ Antasyah) [PPP]于 FG8.8855 大路府 三 馬拉 島本町接井3丁目1杏1号小野頂品工業株 其会社 水積減配合研究所内 Osata (P),百田 優姓 (YOSHTDA-Tatao) [PPP]于 FG8.8855 大阪府三局部 岛本町保井3丁目1番1号小野溝品工業株工会社 水衡湖综合研究所内 Osata (P)。

2002年7月30日(30.07.2002)

PCT/JP02/07735

(74) 代理人: 大袋 約久 (OHLE,Kualiblas); 〒103-0013 東京 部 中央区 日本協人形町 2 丁目 2 巻 6 号 旭口第 2 ピルフ階 大製物等器所 Tidyo (IP).

Ê 

/战梁有/

(54) This: Substance specific to PD-1

(72) 名明寺: および (75) 名明寺/出版人 /米国についてのみ): 柴山 史威 (SHIBAYAMA,Shiro) [PV/P]] 〒618-8585 大阪府 三

(7)) 出版人 および (7)) 名明君: 本度 佰 (HONJO,Tasaka) [JP/JP]: 〒606-0001 京都府 京都市 左京区岩倉大宮町 1 9-4 Kyoto (JP).

(71) 出版人 (米回を牌く会ての相定回について): 小野 現品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO, LTD),[JPUP]: アシ1・825 左応庁 大阪市 中央区道等 町 2 丁 日 1 巻 5 号 Osaba (JP).

(30) 優先権データ: 特別2001-23230、2001年7月31日(31.07.2001) JP

(26) 国際公開の書籍: (25) 国際出版の言語: (22) 国際出版日: (11) 国际出国集中:

日本語 四大區

(54) 免明の名称: トロン-1に対し物異性を有する物質

(37) Abstract: A substance comprising a substance recognizing PID-I, a substance recognizing a membrane-protein occurring in the cell membrane wherein PD-I is repressed, and a finiter. The substance specific to PD-I can selectively ecognize PD-I and the membrane-protein occurring in the cell membrane wherein PD-I is expressed and transfer a PD-I suppressive signal. Thus, it is useful in treating and/or preventing diseases caused by immunopathy.

(S7) 要的:

PD-1を認識する物質、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜タ

ンパクを認識する物質およびリンカーからなる物質。

本発明のPD-1に対する特異性を有する物質は、PD-1およびPD-

1が発現している細胞原に存在する原タンパクを選択的に認識し、PD-1

の抑制シグナルを伝路することができ、免疫異常による疾患の治療および/

WO 03/011911 A1

または予防に有用である。

WO 03/011911 A1

2文字コード及び他の路路については、定原発行される名PCTガゼットの毎回に複数されている「コードと昭陌のガイダンスノート」を参照。

PCT/JP02/07735

PCT/JP02/07735

WO 03/011911 1

#### (4) 無 密

# PD-1に対し毎昭在を泊する物質

### 技術分野

S

本発明は、PD-1を認識する物質、PD-1が発現している細胞膜に存 在する膜タンパクを認識する物質およびリンカーからなる物質に関する。

### 背景技術

- 免疫システムは多様な外来抗原に対し応答できる機構を獲得した。その機 **逝出する結果となったが、これら自己反応性リンパ球は胸膜や骨髄における** 様とはT細胞、B細胞においてV(D)J断片の組替えにより抗原レセプタ **一の多様性をもたらすものである。この機構は同時に自己反応性リンパ球を** 負の選択によって除かれ、更に末梢においてもクローン除去やアナジーとい う自己免疫寛容機構により制御されている。 2
- 自己免疫疾患は、自己免疫寛容の破綻により発症すると考えられるが、そ の発症機序の解明に向けて様々な疾患モデルマウスを用いた研究がなされて きた。しかし、自己免疫疾患の病因学的解明や自己免疫寛容の分子機構に関 しては佐然不明な点が多い。このような状況において、単一遺伝子欠損にて

2

/ーマウス (Watchouse, P. et al.: Science 270:985~988, 1995, Tivol, E.A. et al.:Immunity, 3:541~547,1995) SHP-1 女摄 mothaten mice (Shulltz L.D. et al.: Cell,73:1445~ 1454, 1993)、TGF-β-1ノックアウトマウス (Shull.M.M. et al.:Nature, 359: 693 自己免疫疾患を発症するマウスの存在は、分子生物学的な観点から病因学的考 第を図る上で値かて重要である。 数死性全身性リンパ球浸潤を起すCTLA4ー ~699, 1992) や、糸球体腎炎を発症する 1 y n ー / ーマウス (Hibbs,M.L.etal.: Cell, 22 ឧ

83: 301~311, 1995) 、及びFCRIIB-/ーマウス (Bolland,S.&

Ravetch,J.V.:Immunity,13: 277~285, 2000) 等けその代表であり、これらの分子 と自己免疫寛容との関連が研究されている。

PD-1は免疫グログリンファミリーに属する55kDの1型膜タンパク である。マウスPD-1とヒトPD-1は共に288個のアミノ酸からなり、

ある疎水性領域を有する (The EMBO 1, vol. 11(11), 3887~3895 (1992) ; 特開 N末端のシグナルペプチド (20アミノ酸) と中間部位に細胞膜貫通領域で 平 5-336973 号; EMBL/GenBank/DDJB Acc. No.X 67914、Genomics23:704  PD-1の発現は、胸腺細胞においてはCD4-CD8-からCD4+C

- D8+細胞に分化する際に認められる (Nishimura,H. et.al.:Int.Immunol., 8:773 ~780, 1996, Nishimura,H. et.al.: J.Exp.Med.,191: 891~898, 2000) 。 また、 末梢 細胞、B 細胞(Agata, Y. ct.al.:Int. Innmunol., 8: 765~772, 1996)及び活性化マクロ においてPD-1の発現は、抗原レセプターからの刺激により活性化したT ファージを合む骨間番脳に努められる。 2
- PD-1は、その細胞内領域にITIM(Immunoreceptor tyrosine—based PD-1欠損マウスにおいて糸球体腎炎、関節炎といったループス模自己免 ~1572, 1998, Nishimura,H. et.al.:Immunity, 11: 141~151, 1999) 冬、拡張性心筋 疫病 (C57BL/6遺伝子背景) (Nishimura,H. et.al.:Int.Imuunol,, 10: 1563 inhibitory motif)を有し、従って免疫反応における魚の制御因子と考えられる。 13
- 症様疾患 (BALB/c遺伝子背景) (Nishinum,H. et.al.:Science,291: 319~322, 2001)を発症することから、PD-1が自己免疫疾患発症の、特に末梢自己 免疫寛容の制御因子であることが明らかとなった。 ន

### 発明の開示

PD-1は様々な自己免疫疾患の制御因子であり、自己免疫疾患の原因遺 **伝子の一つであると考えられる。PD-1の機能を制御することにより、免** 52

御する物質に係る本発明に到達した。 を行えると考えて、鋭館検討を追ねた結果本発明者らはPD-1の機能を制 疫機能の低下または亢進、感染症、移植時の拒絶反応、腫瘍等の治療や診断

免疫を司るリンパ球への刺激は主にて領胞の協合工細胞受容体(TCR)

- を、B細胞の協合B細胞受容体(BCR)を介し伝わり、その分子機構には **細胞内リン酸化反応が屈取な役割を担っている。**
- **食に懸飾していることが兜らかとなり、またPD−1の館筒を飼養にITI** M (Immunoreceptor tyrosine—based inhibitory motif) を有することから、本発 PD-1が免疫系においてリンパ球や骨髄系細胞等様々な免疫担当細胞を
- 5 明希らは、PD-1の均断性シグナル伝递における分子機構は成りン酸化酶 よってアロー1の抑制性シグナルが伝わることを確認し、本発明を完成した。 掻った。本発見拾らは、PD-1とTCRあるいはBCRを採締した物質に させることによって、PD-1の機能を発現させることができると考えるに 繋のリクルートと始えた。従って、TCRやBCRの近傍にPD-1を位置
- ᅜ 思いは、102億抗体やベイノリッド抗体と序は。 本ベイノリッド抗体は、 と抗BCR抗体あるいは抗CD3抗体を採摘し、2個抗体を作製した。本発 阪タンパクであり、TCRを構成する複合体の一つである。抗PD-1抗体 を用いて上記の考えが正しいことを確認した。CD3とはT細胞に発現する 本発明者らは、まず抗PD-1抗体と抗BCR抗体あるいは抗CD3抗体
- 20 本発明名により初めて作製されたものである。

ナルが伝遊するとの知見も、今回初めて得られたものである。 いの本く人ノリッド抗体で2種の政体体を保癌することによりシグ

すなわち本発明は、

- 1. PD-1を認識する物質、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜
- 25 タンパクを認識する物質はよびリンガーからなる物質
- 2. PD-1を認識する物質、PD-1が発現している細胞原に存在する膜

タンパクを認識する物質およびリンカーからなる 2 価物質である前記 1 記載

- 3. 膜タンパクが、T細胞膜またはB細胞膜に存在するタンパクである前記 1または2に記載の物質
- 職する物質またはB細胞受容体複合体を構成するタンパクを認識する物質お 4. PD-1を認識する物質、T細胞受容体複合体を構成するタンパクを認 よびリンガーからなる質問1まれは2に記録の物質
- 5. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々2から 5 量体である前記1乃至4のいずれかに記載の物質
- 5 両方が抗体である前記1乃至5のいずれかに記載の物質 6. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質の片方あるいは
- 両方が、抗体のFab部分である前記6のいずれかに記録の物質、 7. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質の片方あるいは
- 8. リンカーが有機化合物からなる前記1万至5のいずれかに記載の物質。
- ᅜ 9. リンカーがペプチドからなる前記1乃至5のいずれかに記載の物質
- テドである前記1乃至5のいずれかに記載の物質、 10. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々ペナ
- の重償可変領域と軽償可変領域を含む複数のペプチドで構成される前記1乃 11. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々抗体
- 8 至5のいずれかに記載の物質、
- 各々ペプチドである前記1乃至5のいずれかに記載の物質、 12. PD-1を認識する物質、タンパクを認識する物質およびリンカーが、
- 予防に有効な量含有する薬学的組成物 13. 前記1に記載の物質を、PD-1が関与する疾患の治療およびまたは
- 25 び感染症からなる群から選ばれる疾患である前記13に記載の薬学的組成物 14. 疾患が神経変性疾患、自己免疫疾患、臓器移植片拒絶反応、腫瘍およ

PCT/JP02/07735

- 15. 神経変性疾患が、パーキンソン病、パーキンソン症候群、ヘンチントン病、マシャドジェセフ病、紡養箱性回染硬化症、クロイツフェルトヤコブ消からなる群から選ばれる前記14に記載の薬学的組成物、および
- 16. 自己免疫疾患が、糸球体骨炎、関節炎、拡張性心筋症様疾患、潰瘍性 5. 大腸炎、シェーグレン症候群、クローン病、全身性エリテマトーデス、慢性 関節リウマチ、多発性硬化症、乾鮮、アレルギー性接触性皮膚炎、多発性筋 炎、強皮症、結節せい動脈周囲炎、リウマチ熱、尋常性白斑、インスリン依 存性糖尿病、ベーチェット病および橋本病からなる群から選ばれる前配14 に配敷の薬学的組成物に関する。
- 10 本発明で言うPD-1を認識する物質とは、韓異的にPD-1を認識する 物質であれば良く、例えば、抗PD-1抗体、抗PD-1抗体の断片、PD-1自体、PD-1の断片、PD-1の以ガンド (PD-L1 (Freman,G.J. et.al: J.Exp.Med, 192: 1027-1034, 2000) 、PD-L2、PD-H3)、それ らの断片、低分子有機化合物等が挙げられる。
- より具体的には、2001年5月30日付で日本国茨城県つくば市東1丁 目1番地1 中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物者能センターに第 FERM P-18356 号として高託され、2002年7月16日付で、国際者託番号 FERM BP-8118 として国際者託に移管されている「J43」と命名したハイブリドーマが産生する抗PD-1抗体である。
- 20 好ましくは、この抗体のFab部分であるが、これに限定されるものではたい。

本発明で言うPDー1が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質とは、特異的にその膜タンパクを認識する物質であれば良く、例えば、T細胞上に発現するT細胞受容体(TCR)を構成する複合体(TCR 複合体)等、B細胞上に発現するB細胞受容体(BCR)を構成する複合体(TCR 複合体)等、B細胞上に発現するB細胞受容体(BCR)を構成する複合体(BCR

23

体を構成するタンパクの断片、抗TCR抗体、抗TCR抗体の断片、BCR 複合体を構成するタンパクの断片、抗BCR抗体、抗BCR抗体の断片等が ※げられよ 好ましくは、抗丁CR杭体のFab部分、抗BCR抗体のFab部分であ

るが、これに限定されるものではない。

抗丁CR抗体および抗BCR抗体は、市販されているものを使用することができる。例えば、抗丁CR抗体としては、抗CD3抗体(αーCD3;mAb、Pharmingen 社製)、抗BCR抗体としては、抗1gG(H+L)ポリクローナル抗体(Zymed 社製)が入手可能である。

- 10 本発明で言うリンカーとは、上記のPD-1を認識する物質およびPD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンバクを認聴する物質を適切な距離を保って繋ぐことができるもので有れば特に原定されない。より具体的には、ペプチド、アミド等が挙げられる。
- リンカーは、市販されているものを使用することができ、例えば、フェニ
  - 15 レンジャレイミド (Phenylenedimaleimide、Aldrich 社製) が入手可能である。 本発明の主体であるPD-1に対する特異性を有する物質は、例えば以下のようにして作製することができる。

PD-1を特異的に認識する物質として抗体を避び、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパク(以後、単に膜タンパクと省略する。)を

- 20 特異的に認識する物質も抗体である物質を本発明では、ハイブリッド抗体と呼ぶ。このヘイブリッド抗体の作製法について説明する。
- (1) PD-1あるいは膜タンパクを免疫抗原として、動物に感作し、
- (3) 處作動物の聛部間と感作動物由来のミエローマ細胞を細胞融合し、
- (3) 得られたハイブリドーマより、殴作抗原 (PD-1あるいは酸タンパ
- 25 ク)に対するモノクローナル抗体を産生する細胞をスクリーニングし、
- (4) 目的とする抗体選生ハイブリドーマをクローニングし、

- (5) クローン化された抗体産生ハイブリドーマを増殖させ
- (6) 産生された抗体を分離精製し
- 段することができる。 (7) 谷られた抗PD-1抗体と抗康タンパク抗体をリンカーで保備して作
- あるいは、(8) F(ab') aを得るため、更にペプシン処理をし、分解
- (9) 阿敷したそれぞれのF (a b') 2を返元し、分降常敷し
- (10) 類似したそれぞれのFabshをリンカーの保積して行戯することが
- 5 **竹板化合物である場合は、** パク)をそれぞれ特異的に認識する物質として、両方あるいは片方が低分子 PD-1とPD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパク(膜タン
- その結合を阻容する低分子を見出し あるいは膜タンパクとの結合を適当な検出装置によって測定することにより (11) 上記の手法で作製した抗体を用い、それぞれの抗原であるPD-1

2

して存動することができる。 (12) その低分子同士あるいは抗体またはFabをリンカーによって架橋

より具体的に各ステップを説明すると以下のようになる

- (1) 感作の工程では、PD-1あるいは膜タンパクは感作動物に腹腔内数
- 20 200μ gを投与すれば十分である に限定されない。抗原の投与量は、例えばマウスの場合、1回につき10~ ス、ラットなどの一般にキノクローナル抗体が得られている動物であれば特 与あるいはフットパットに投与することが好ましい。また感作勁物は、マウ
- (2)の餌蹈躍合は、(1)で免扱殴作した殴作闘物のうち、抗体値が十分
- 25 野梨つ、次に命られた犀番間と威作動物由来のパルローを錯問との混合物に **ド土界したまた感作劇物の開闢を指出し、粘液に徐った、開節間の懸適波を**

NS1/1-Ag4-1、SP-2/0-Ag-14など数額類が知られて おり、いずれも容易に入手可能である 37℃でポリエチレングリコール (好ましへは、PEG4000) を加えること によって行なわれる。 アウスミエローア笛覧には P3×63Ag8、P3/

- にミエローを細胞自身が抗体を分泌しない細胞株であることが望ましい。好 ン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ)欠扱細胞株が有用であり、さら 適にはSP-2/0-Ag-14が用いられる。 ミジンを含む焙粕)では生存できないHGPRT (ヒポキサンチン・グアニ パエローや細胞はHAT格地(ヒポキサンチン、アパノプテリンおよびチ
- 5 脾細胞同志のハイプリドーマは生存条件が満足されないため死滅し、脾細胞 ローを答問、ペメローを錯聞回志のペイプリドーを、みらに朱敬命の顕善問 と、スローを結婚とのベイブリドーをのみが増殖してへる。 レートに分注し、HAT培地で培養する。1~2週間の培養で未融合のミエ 次に、得られた細胞融合の混合物を、低細胞密度で96マイクロウェルブ
- 5 生しているハイブリドーマか否かを判定する。 いて定量することによって、PD-1あるいは膜タンパクに対する抗体を窟 応させ、抗原に特異的に吸着した上滑中の抗体を、標識された第 2 抗体を用 (3) のスクリーコングは、ハイブリドーマ培養上滑と固相化した抗原を反
- (4)の工程は、抗体産生ハイブリドーマを軟寒天培養法(Monoclonal
- 20 Antibodies,372 (1980) ) に従ってクローニングすることによって行なわれる この際、限界希釈法を用いることも可能である。
- 25 水中より分離精製する方法が用いられる。 率よへ得るにはハイブリドーマをマウス腹腔内に投与し、増殖させ、その腹 その培養上滑から分離精製することにより得られるが、より大量の抗体を効 (5) の工程は、クローン化されたハイブリドーマを通常の培地で培養し、
- (6)の工程は、通常の方法、例えば塩析、イオン交換クロマトグラフィー、

などにより精製できるが、より効果的にはプロテインA-セファロースCL **-4B (アマシャムパイオサイエンス社製) を用いたアフィニティークロマ** ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー トグラフィーが用いられる。

- 1の精製および繊維、例えばアフィニティークロマトグラフィーなどに利用 本発明のヘイブリッド抗体は、PD-1を特異的に認識するので、PD-Fることができる。 S
- レイミドカプロキシ)スルフォスクシンイミドナトリウム塩)を抗体のアミ (1)の工程は、架橋剤として、例えばスルフォーEMCS (N- (6-マ
  - ド基またはSH(メルカプト)基に結合させることで架備できる。どちらか 一方の抗体をまず sulfo-EMCS とアミドカップリング結合させ、未反応の た他方の抗体のSH(メルカプト)基と最初の抗体に結合した sulfo-EMCS の sulfo-EMCS をゲルろ過で分盤し、2ーメルカプトエチルアミンなどで溺无し **レレイミド基を反応させ、ゲルろ過で2箱の抗体同士が架橋されたものを分** 2 13
- (8) の工程は、行程(6)で得られたそれぞれの抗体にペプシンを加え、
- 37℃で48時間消化する。ペプシン消化されたド(ab')、1の分解精製に **疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどにより** は、通常の方法、例えば塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、
- 精製できるが、より効果的にはセファクリルSー200 (アマシャムパイオ サイエンス社製)を用いたゲルろ過が用いられる。 2
- で30分間遠元する。遠元されたFab<sub>3H</sub>の分離精製には、通常の方法、例 (9) の工程は、F(ab') よに2ーメルカプトエタノールを加え、30℃ えば塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、疎水性クロマトグラ フィー、アフィニティークロマトグラフィーなどにより精製できるが、より 25

効果的にはセファクリルS-200を用いたゲルろ過が用いられる。

WO #3/#11911

PCT/JP02/07735

(10)の工程は、一方の抗体のFabsH 阿分にリンカーを結合させる。架 他方のFabgHを1.3 倍量加え、 室温で4時間反応させる。 得られる2 価の特 異性を有する物質の分離精製は、通常の方法、例えば塩析、イオン交換クロ 橋剤としてFabshのメルカプト(SH)基に結合できるものであれば良く、 例えばフェニレンジやレイミドを加え、 室温で30分間反応させる。 次に、

マトグラフィー、ゲルる過、苺水性クロマトグラフィー、アフィニティーク ロマトグラフィーなどにより精製できるが、より効果的にはセファクリルS 一200を用いたゲルろ過が用いられる。 (11) の工程は、工程(6)で得られた抗体をそのまま用いるか、常法に

より適当に標職(例えばピオチン化標職、FITの標職等)して用いること 場合は、酵素擦喰したストレプトアビジンを添加した後、抗体と抗原との特 ができる。ELISA法を用いる場合は、常法により抗原を固相化し、抗体 を添加する。次に酵素標職した2次抗体、ピオチン化媒職した抗体を用いる 異的結合を、クロモフォー産生物質存在下で吸光光度計により測定する。 2

のアッセイ系を用いることによって、PD-1あるいは膜タンパクを特異的 に怒職する低分子が得られる。 2

(12) の工程は、片方が抗体あるいはFabである場合、得られた低分子 に適当な官能甚を導入することで、抗体あるいはFabと結合させることが できる。例えば、マレイミド基を導入すれば、抗体あるいはFabのメルカ

プト(SH)基に結合させることが可能である。また、低分子同士であれば、 両物質を含む分子を合成することが可能である。 ន

PD-1を伸鼻的に認識する物質として抗体を、PD-1が発現している これらを一つのペプチド中に含有する物質を本発明では、パイスペシフィッ 細胞膜に存在する膜タンパクを特異的に認識する物質としても抗体を選び、

**ク抗体と呼込。このベイスペツフィック抗体の作製法にしこト税明する。** 23

(1) 抗PD-1抗体および抗膜タンパク抗体産生ハイブリドーマから抗体

PCT/JP02/07735

## 遺伝子を耳舞し、

- (2) 抗PD-1抗体徴伝子の可愛領域と抗膜タンパク抗体遺伝子の可愛領域をリンカーDNAを用いて連結し、連結したDNA断片を発現ベクターに組み込み、細胞に発現ベクターを導入して均殖させ、
- (3) 遊生されたタンパクを分離控製してバイスペシフィック抗体を作製することができる。
- より具体的に各ステップを説明すると以下のようになる。
- (1)の工程は、ハイブリドーマ細胞からRNAを単離し、抗体遺伝子またはその部分ペプチドをコードする。DNAを単離する工程からなる。
- 10 ハイブリドーマ和胞から全RNA(total RNA)またはmRNAを単離する工程は、公知の方法(以下、公知の方法は特に記載がなければ Molecular C loning (Sambrook, J., Fritsch, E. F.および Maniatis, T. 著、 Cold Spring Harb or Laboratory Press より 1989 年に発刊)または Current Protocol in Molecular Biology (F.M.Ausubel ら編、John Wiley & Sons, Inc.より発刊)に記載の方法) に従って行うことができる。
- 本発明の抗体遺伝子またはその部分ペプチドをコードする。DNAのクローニングの手段としては、本発明の抗体タンパク質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて、ポリメラーゼ連銀反応(Polymerase Chain Reaction;以下、PCR法と略称する。)によって増殖するか、または適当なペクターに組み込んだ。DNAを本発明の抗体タンパク質の一部あるいは全
- 20 ベクターに組み込んだ。DNAを本発明の抗体タンパク質の一部あるいは全 質域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて頻識したものとの ハイブリダイゼーションによって強別することができる。ハイブリダイゼー ションの方法は公知の方法に従って行うことができる。抗体遺伝子は、全R NA (total RNA) またはmRNAを用いて直接、逆転写酵窯ポリメラーゼ 35 連鎖反応(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction;以下、RT-P
- 連貫反応(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction;以下、RT-PGR独と略称する。)によって増幅することもできる。

- (2) 本発明のパイスペシフィック抗体を取得する方法としては、
- i) ペプチド合成する方法、または
- i)遺伝子組み換え技術を用いて生産する方法、

などが挙げられるが、工業的にはfi)に記載した方法が好ましい

- 3 遺伝子組み換え技術を用いてペプチドを生産するための発現系(宿主ーペクター系)としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系が挙げられる。
- 例えば、大腸菌で発現させる場合には、例えば、配列番号28で示される 塩基配列の5 末端に開始コドン (ATG) を付加し、得られたDNAを、適 10 当なプロモーター (例えば、trpプロモーター、1acプロモーター、1 PLプロモーター、T7プロモーター等)の下流に接続し、大腸菌内で機能 するベクター (例えば、pBR322、pUC18、pUC19等)に挿入して発現ベクターを作製する。
- 次に、この発現ベクターで形質転換した大腸菌(例えば、E. Coli DH1、15 E. Coli JM109、E. Coli HB101株等)を適当な培地で培養して、その菌体より目的とするベプチドを得ることができる。また、ベクテリアのシグナルベプチド(例えば、pelBのシグナルベプチド)を利用すれば、ベリプラズム中に目的とするベプチドを分泌することもできる。さらに、他のベプチドとのフュージョン・プロテイン(fusion protein)を生産することもできる。
- また、哺乳動物細胞で発現させる場合には、例えば、配列番号28で示される塩基配列を適当なベクター(例えば、レトロウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等)中の適当なプロモーター(例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、メタロチオネインプロモーター等)の下流に挿入して発現ベクタ
- 25 モーター、メタロチオネインプロモーター等)の下流に挿入して発現ベクターを作喫する。次に、得られた発現ベクターで適当な哺乳動物細胞(例えば、

135

サルCOS-1細胞、COS-7細胞、テャイニーズハムスターCHO細胞、マウスL細胞、293T細胞等)を形質転換し、形質転換体を適当な培地で培養することによって、その培養液中に目的とするペプチドが分泌される。

大路菌を形質変換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), vol. 69, 2110 (1972)や Gene, vol. 17, 107 (1982)などに配載の方法に従って行うこと \*\*\*\*\*\*\*\* 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール, 263 (秀潤社より 1995 年に発行) や Virology, vol. 52, 456 (1973) などに記載の方法に従って行うことができる。

- 10 遺伝子組み換え技術を用いて直接パイスペシフィック抗体を作製する技術が知られている。例えば、Att ら、FEBS Letter, vol. 454, 90 (1999)によって、無路児抗原および大陽商 B-ガラクトシダーゼに対するパイスペシフィック抗体 (シングルチェーンダイアボディーと呼ばれる。) の作製が報告されている。該断片は同一費上の2つの連続したドメイン間で対合するには短すぎる
  - 15 リンカーによって一方の塩貸可資ドメイン (VH)と他方の軽偿可変ドメイン (VL) が連結されている。そのため、該断片のVHおよびVLドメインは、別の断片の相補的VLおよびVHドメインと対合することを余騰なくされ、それにより2つの抗原結合部位を形成する。

ペプチドリンカーは3-12アミノ酸残基が好ましいが、配列は特に限定

20 されない (Hudson 5、J. Immunol. Met., vol. 231, 177 (1999))。 (3) 以上のようにして得られたペプチドは、通常の方法、例えば塩析、イ

(3)以上のようにして得られたペプチドは、通常の方法、例えば塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルる過、確水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどにより精製できる。

本発明のパイスペシフィック抗体もまた、PD-1を待異的に窮職するの25 で、PD-1の精製および養稽、例えばアフィニティークロマトグラフィーなどに利用することができる。

WO 03/011911

PCT/JP02/07735

産業上の利用可能性

[医薬品への適用]

本発明のPD-1に対し待異性を有する物質の最大かつ重要な利用方法は 下配の疾患の治療に用いることである。 5 本発明のPD-1に対し特異性を有する物質は、例えば、神経変性疾患(バーキンソン病、バーキンソン症砂群、ハンチントン病、マシャドジェセフ病、筋萎縮性側類硬化症、クロイツフェルトヤコブ病等) 等の疾患の治療および/丈夫は予防に有用である。

また、本発明のPDー1に対し特異性を有する物質は、PDー1が関与し、 布むFFが下海ナストレアトスが用。回りは、GDAを企画(SSTABA

- 10 免疫反応が亢進することによる疾患、例えば、自己免疫疾患(糸球体腎炎、関節炎、拡張性心筋症傷疾患、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、クローン病、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、乾鮮、アレルギー性接触性皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、枯節せい動脈周囲炎、リウマチ熱、尋常性白斑、インスリン依存性糖尿病、ペーチェット病、橋本病
  - 15 等)、聯語移植片拒絶反応、アレルギー等の疾患の治療および/または予防に有用である。

また、本発明のPD-1に対しや異性を有する物質は、PD-1が関与し、 免疫反応が低下することによって引き起こされる疾患、例えば、腫瘍、感染 症等の疾患の治療および/または予防に有用である。 20 本発明のPD-1に対する特異性を有する物質を上配の目的で用いるには、 通常、全身的または局所的に、経口または非経口の形で投与される。

投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人一人あたり、1回につき、0.1 mgから100mgの範囲で、1月1回から数回経口投与されるか、または成人一人あたり、1回につ

25 き、0.01 mgから30mgの範囲で、1日1回から数回非揺口投与(好ましくは、静脈内投与)されるか、または1日1時間から24時間の範囲で静脈

内に特税投与される

上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場

- 粒剤等が含まれる。カプセル側には、ハードカプセルおよびソフトカプセル **被剤、および非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤等として用いられる** 本発明化合物を投与する際には、経口投与のための内服用固形剤、内服用 稻口牧与のための内服用固形剤には、鏡剤、丸剤、カプセル剤、散剤、販
- 5 **リアニグアロジドン、メタケイ数アグミン数トグネッウム等)、 斑薮蛇(数** 晶セプロース、アンプン母)、結合衒(ヒドロキシプロアグセルロース、ボ そのままか、または賦形剤(ラクトース、をンニトール、グルコース、微枯 維案グリコール酸カルシウム等)、滑沢剤(ステアリン酸マグネシウム等)、 このような内服用固形剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質が
- 2 いてもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含さ ロースンタレート等)な被駁していてもよいし、また2以上の層な被撥した ゼラチン、ヒドロキシプロアルセルロース、ヒドロキシプロアルメチルセス 安定剤、溶解補助剤(グルタミン酸、アスパラギン酸等)等と混合され、常 **治に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤(白盤**
- は、短润剂、强溢化剂、乳化剂、甘味剂、風味剂、芳香剂、保存剂、级ű剂 たはそれ以上の活性物質が、一般的に用いられる希釈剤(精製水、エタノー シロップ病、エリキシル剤等を含む。このような液剤においては、ひとしま ルまたはそれらの混液等) に容解、隠濁または乳化される。さらにこの液剤 経口投与のための内服用被剤は、薬剤的に許容される水剤、懸濁剤、乳剤

20

25

母を含有していてもよい。

もちろん問記したように、牧与童は、独々の条件によって疾動するのな、

5 た無菌の固形剤、例えば凍結乾燥品を製造し、その使用前に無菌化または無 懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤等を含んでいてもよい。 これ 剤(グルタミン酸、アスパラギン酸、ポリンルベート80(登録商標)等)、 ール、ポリエチレングリョール、エタノールのようなアルコール頻等および 菌の注射用蒸留水または他の容剤に溶解して使用することもできる。 らは最終工程において威菌するか無菌操作法によって製造、関製される。ま それらの組み合わせが用いられる。さらにこの注射剤は、安定剤、溶解補助 **溶剤として、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、植物油、プロピワングリロ** またはそれ以上の括性物質を溶剤に溶解、脂菌または乳化させて用いられる 剤に溶解または懸濁して用いる固形の注射剤を包含する。注射剤は、ひとつ 非経口投与のための注射剤としては、溶液、懸濁液、乳濁液および用時溶

スプレー剤、坐剤および膣内投与のためのペッサリー等が含まれる 性物質を含み、常法により処方される外用液剤、軟膏剤、強布剤、吸入剤、 非経口投与のための、その他の製剤としては、ひとつまたはそれ以上の活

- ᅜ 号に詳しく記載されている **プレー剤の製造方法は、例えぱ米国特許第 2,868,691 号および同第 3,095,355** ン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。ス ような安定剤と等張性を与えるような緩衝剤、例えば塩化ナトリウム、クエ スプレー剤は、一般的に用いられる希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムの
- 8 免疫反応に関与する物質のスクリーニング等にも利用することができる。 る特異性を有する物質を用いて、PD-1の発現を測定することによって、 PD-1は、免疫反応に関与していることから、本発明のPD-1に対す

25 質、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質お よびそれらを繋ぐリンカーからなり、PD-1および瞑タンパクを特異的に 本発明のPD-1に対する特異性を有する物質は、PD-1を認識する物

WO 03/011911

PCT/JP02/07735

**認識し、Pロー1ングナルを伝達することができる優れた物質である。** 

## 図面の簡単な説明

図1は、抗PD-1/抗TCRハイブリッドFab抗体のFACS解析を

図2は、活性化T細胞に対する抗PD-1/抗TCRハイブリッドFab 抗体の効果を示す。 図3は、抗PD-1/抗BCRハイブリッドFab抗体による抗BCR抗 体刺激に対する11-2産生抑制効果を示す。 図4は、抗PD-1/抗BCRハイブリッドFab抗体による抗BCR抗 体刺数後のSHP-2動画効果を示す。 2

図5は、143-2C11 パイスペシフィック抗体発現プラスミド 143-2C11seDbpSechygro B を示す。 図 6 は、活性化マウス弾膜 T 細胞の JPN-r 強生に対する 143-2C11 パイスペ

シフィック抗体の効果を示す 13

# 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明 の範囲を制限するものではない。

抗PD-1/抗TCRハイブリッド抗体、抗PD-1抗体と抗B縮脳受容体 抗体をリンカーで繋いだものを、以下、抗PD-1/抗BCRハイブリッド 抗体と略記する。また、抗PD-1抗体のFabsH面分と抗T細胞受容体抗 体のFabsr 画分をリンカーで繋いだものを、以下、杭PD-1/抗TCR ハイブリッドFab抗体、抗PD-1抗体のFabsn画分と抗B細胞受容体 抗体のFabsH面分をリンカーで繋いだものを、以下、抗PD-1/抗BC 抗PD-1抗体と抗T舗脳受容体抗体をリンカーで繋いがものを、以下、 22 ឧ

12

RハイブリッドFab抗体と略配する。

(1) 杭PD-1/杭TCRハイブリッド杭体の簡数

(1-A) 抗マウスCD 3 εモノクローナル抗体のマレイミド化

抗マウスCD 3 εモノクローナル抗体をリン酸ナトリウム (0.1M, p H7.0) NaC1 (50mM) で置換した後、200倍量のsulfo-EMCS (同 仁化学研究所製)を加え、20℃で1時間反応させた。その後、セファクリ ルSー300 [リン酸ナトリウム (0.1M, pH7.0) ] を用いてゲルろ過を行

V、280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した。また、 同時に280mmの吸光度からタンパク量も算出した。 2

(I-B) 抗PD-1抗体の適元

マウスPD-1 に対するモノクローナル抗体 (国際者託番号 FERM BP-8118 として、国際杏託されている「J43」と命名したハイブリドーマが産生す

エチルアミン (終設度10mM)、EDTA (終設度1mM) を加え、37℃ る。) をリン酸ナトリウム (0.1M, p H6.0) で置換した後、2ーメルカブト pH6.0) 、EDTA (1mM) ]を用いてゲルろ過を行い、280nmの吸光 度をモニターし、主要ピーク画分を分取した(シングルチェーン画分)。 ま で90分間路元した。セファクリルS-300 [リン酸ナトリウム (0.1M, 23

(I-C) マレイミド化抗マウスCD3 sモノクローナル抗体と遠元抗 P D ー た、同時に280ヵmの吸光度からタンパク最も算出した。 ន

リルS-300 [リン酸ナトリウム (0.1M, pH7.0)]を用いてゲルろ過を マレイミド化抗マウスCD 3 f モノクローナル抗体と遠元抗PD-1 抗体 を1:4の割合で混合し、15℃で18時間反応させた。その後、セファク 行い、280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク団分を分取した。また、 22

同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。

(2) 抗PD-1/抗TCRハイブリッドFab抗体の関数 (2-A) 抗PD-1抗体のF (a b') a回分の題数 マウスPD-1に対するモノクローナル抗体 (国際告託番号 FERM BP-8118

280 nmの吸光度をモニターし、主要ピーク回分を分取した(F (ab') る。) をペプシンーパッファー [酢酸ナトリウム (0.1M, pH4.5) 、NaC として、国際告究されている「 ] 43 ] と命名したハイブリドーケが選生す 7℃で48時間消化した。その後セファクリルS-200 [Tris-HC 1 (0.1M) ] に個換したのち、ペプシン (終微度 0.2m g/m L) を加え、3 l (0.2M, pH8.0) 、EDTA (10mM)]を用いてゲルろ過を行った。

5 』画分)。また、同時に280mmの吸光度からタンパク量も算出した。 (2-B) 抗PD-1抗体のFab<sub>9H</sub>回分の関製

30℃で30分間退元した。米冷したのち、セファクリルS-200 [酢酸 F(a b')。回分に2ーメルカプトエタノール(終徴度20mM)を加え

2 ナトリウム (50mM, pH6.3)、EDTA (1mM)]を用いてゲルろ過 a b sn回分)。また、同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。 を行い、280mmの吸光度をモニターし、主要ピーク風分を分取した(F 抗マウスCD3 f モノクローナル抗体 (Pharmingen 社製) をペプシンバッ (2-C) 抗マウスCD 3 ε モノクローナル抗体のF (a b') p 国分の顕数

20 のち、ペプシン(終謗度 0.2mg/ml)を加え、37℃で48時間消化した。 ファー [酢酸ナトリウム (0.1M, pH4.5) 、NaCl (0.1M) ] に置換した ターし、主要ピーク画分を分取した(F (ab')。画分)。また、同時に2 TA(10mM)]を用いてゲルる過を行った。280mmの吸光度をモニ その後セファクリルSー200 [Tris-HCl (0.2M, pH8.0)、ED

z 80mmの吸光度からタンパク量も算出した。

(2-D) 抗マウスCD 3 ε モノクローナル抗体のF a b s H 画分の飼製

体のFabsh面分の架橋 a b sr回分)。また、同時に280 nmの吸光度からタンパク量も算出した。 を行い、280mmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した(F ナトリウム (50mM, pH6.3)、EDTA (1mM)]を用いてゲルろ過 30℃で30分間遠元した。米冷したのち、セファクリルS-200 [酢酸 (2-B) PD-1抗体のFab<sub>sH</sub>四分と抗マウスCD3 εモノクローナル抗 F (ab') 2両分に2ーメルカプトエタノール (終機度20mM) を加え

2 5mM)を加え、遮光下、室温で10分間反応させた。 応させた。次にTris-HCl (1M, pH8.0) を適量加えることで反応 れを J 4 3 F a b \_\_\_, 画分とした。 J 4 3 F a b \_\_, | 画分及U坑マウスCD 3 30℃で30分間反応させた。ヨードアセトアミド (SIGMA 製) (終濃度2 熔液のpHを8.0にし、2ーメルカプトエタノール (終溢度20mM) を加え イミド(Aldrich 製)(終設度4mM)を加え、室温で30分間反応させ、こ εモノクローナル抗体のFabsμ囲分を1:1.3 の比で加え、室温で4時間反 (2-A)で関致したPD-1に対する抗体のFabsn回分にフェニアンジャフ

EDTA (1mM)]を用いてゲルろ過を行い、280nmの吸光度をモニ nmの吸光度からタンパク量も算出した。 ターし、主要ピーク画分を分取した(BsAb画分)。また、同時に280 最終的に、セファクリルS-200[酢酸ナトリウム (50mM, pH6.3).

D-1及びCD3) に対する反応笛の暗器 奥塩例2:抗PD-1/抗TCRハイブリッドFab抗体の細胞要面抗原(P 20

PD-1 陰住CD 3 陽性約距としてマウス脾隙卻陷から顕製したナイープT PD-1陽在CD3降在街路としてmPD-1/A 20IIA1.6、

z **細胞を用い、1×10°個の各細胞を回収し、91μLのFACSパッファー** 

ロレマウス血清、及び4μLのハイブリッド抗体(2μg)を添加し、30分間氷上で静止した。PBS(一)で、1回洗浄し、二次抗体をそれぞれ2μL (1μg) 添加し、FACSパッファーで最終的に100μLにフィルアップ (fill up)し、30分間氷上で静止した。その後、FACSのanを用5いて麻がを行った。その結果を図1に示す(なお、以下の図において、ハイブリッドFab抗体をHFAbと配す。)。

作製した抗PD-1/抗TCRハイブリッドFab抗体が実際に着脑装面抗原に反応するかどうかを FACSort(ペクトンディキンソン製)を用いて、解析した結果、それぞれの表面抗原に反応することを確認できた。

2

奥施匈3:活性化T細胞に対する抗PD-1/抗TCRハイブリッドFョb 抗体の効果

## (A) 脾臓T細胞の調製

BALB/cマウスから呼ばを摘出し、赤血球を溶血させた後、PBS(一) で1回洗浄し、培地RPMI1640(10%FCS, autibiotics) に懸濁した(1 × 10 ° c o 1 1 s / m L)。さらに培地により平衡化されたT細胞分離用ナイロンファイバーカラム(W a k o 契)を用いてT細胞の単離鞘製した。
(B) 活性化膵臓T細胞に対する抗PD-1/抗TCRハインリッドF a b

- 20 9 6 w e 1 1 ブレートを 0.5 u g / m L 及び 5 u g / m L の抗C D 3 抗体 (クローン名KT 3、Immuntech 製)を3 7 ℃で 3 時間 コートする。 指縮した T 細胞 (2 × 10 ° c e 11 s / w e 11 / 2 0 0 u L) に、 抗P D − 1 / 抗 T C R ハイブリッド 抗体 (0.03、0.1、0.3、1、3 u g / 1 0 0 m L)を加え、CO<sub>2</sub>インキュベーター内 (3 7 ℃)で始業した。 7 2 時間後に回収した格巻 25 上済中のサイトカイン (1 F N ー y、1 L ー 2、1 L ー 4、1 L ー 1 0)の
  - 25 上浦甲のサイトカイン(IFNーγ、ILー2、ILー4、ILー1の) 機度をアッセイキット(R&D system 製)を用いて適定した。

その結果は図2に示す通りであり、3gの抗PD-1/抗TCRハイブリッドFab抗体を用いたときの12時間後において、0.5ug/mL及び5ug/mLのびちュβ/mLのどちらの刺激において1FN-g、1L-4、1L-10の商生を優位に抑制するという結果を得た。

'n

実施倒4:抗PD-1/抗BCRハイプリッドFab抗体の關製

(A) 抗PD-1抗体のF (a b')。面分の配数

マウスPD-1対するモノクローナル抗体 (実施例1で用いたものと同じ 抗体) をペプシンバッファー [酢酸ナトリウム (0.1M, p.H4.5)、NaC1 (0.1M) ] に置換したのち、ペプシン (SIGMA 製) (株徴度 0.2mg/mL)
 を加え、37℃で48時間消化した。その後セファクリルSー200
 (AmarshamParmacia 製) [Tris-HCI (0.2M, p.H8.0)、EDTA (10.mM)]を用いてゲルろ過を行った。280mmの吸光度をモニターし、主要ビーク画分を分取した(F(ab')。両分)。また、同時に280mm

(B) 抗PD-1抗体のFabsH両分の調製

の吸光度からタンパク量も算出した。

2

F (a b') 』面分に2ーメルカプトエタノール (株譲度20mM)を加え、30℃で30分間遠元した。米冷したのち、セファクリルS-200 [酢酸ナトリウム (50mM, pH63)、EDTA (1mM)]を用いてゲルろ過

- 20 を行い、280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク回分を分取した (Fabsm回分)。また、同時に280nmの吸光度からタンパク量も算出した。
  (C) 抗 I g G (H+L) ポリクローナル抗体のF (a b') 。 画分の扇製ウサギ抗マウス I g G (H+L) ポリクローナル抗体 (Zymed 社製)をペプシンパッファー [酢酸ナトリウム (0.1M, p.H4.5)、NaC I (0.1M)]
- 25 に置換したのち、ペブシン(格議度0.2mg/mL)を加え、37℃で48時間消化した。その後セファクリルS-200[Tris-HC1(0.2M, p

H8.0)、 EDTA (10mM)] を用いてゲルろ過を行った。280nmの 吸光度をキニターし、主要ピーク固分を分取した(F(ab')。國分)。 また、同時に280nmの吸光度からタンパク食も算出した。

(D) 抗1gG(H+L)ポリクローナル抗体のFabsn画分の調製

- 10 (E) 抗PD-1抗体のFab゚ロ両分と抗IRG(H+L)ポリクローナル 抗体のFab゚ロ両分の架橋
- PD-1に対する抗体 J 43のF a b s n 回分にフェニレンジマレイミド (Aldrich 製) (終微度 4 m M)を加え、窒塩で30分間反応させ、これを J 43 F a b m , 1 回分及び抗 I g G(H+L)が
- 15 リクローナル抗体のFab<sub>sh</sub>画分を1:1.3の比で加え、室亀で4時間反応させた。次にTrisーHCl(1M, pH8.0)を適量加えることで反応容液のpHを8.0にし、2ーメルカプトエタノール (終濃度20mM)を加え、30℃で3.0分間反応させた。ヨードアセトアミド (SIGMA 製) (終濃度25mM)を加え、遮光下、室温で10分間反応させた。最終的に、セファクリ
- 20 ルS-200 [酢酸ナトリウム (50mM, pH6.3)、EDTA (1mM)] を用いてゲルろ過を行い、280nmの吸光度をモニターし、主要ピーク画分を分取した (BsAb回分)。また、同時に280nmの吸光度からタンパク虫も算出した。

(A)マウスPD-1を強制発現させたA20IIA1.6(B細胞株)のた。

# (1) マウスPD-1発現プラスミドの作製

EcoRiで切り出したmbD1-flagのDNA所片を、市販の発現5 ベクターのBcoRIサイトに組み込み、発現プラスミドmbD1-bAを接続した

# (2) トラシスフェクション

1×10<sup>7</sup>個のA20IIA1.6を325μ1の米希した15%FCSを含むRPMIに懸御した容液とScaI処理により直鎖状にしたPD-1発20RTラスミドを10μ1の蒸留水に懸適した容液をエレクトロボレーション用のキュペット (Gene Pulser Cuvette 0.4cm electrode gap、50、BIO RAD) に添加し、250V/960uF (Gene Pulser、BIO RAD) の設定で結圧をかけた。その後、10分間、重温で静置し、30m1の培地(RPMI1640中に10%FBS、50uM2-メルカプトエタノール、ペニシリン、ストウに10%FBS、50uM2-メルカプトエタノール、ペニシリン、ストトト10%FBS、50uM2-メルカプトエタノール、ペニシリン、ストトト10%FBS、50uM2-メルカプトエタノール、ペニシリン、ストトト10%FBS、50uM2-メルカプトエタノール、ペニシリン、ストトト10%FBS、50uM2-メルカプトエタノール、ペニシリン、ストトト10%FBS、50uM2-メルカプトエタノール、ペニシリン、ストリティシンを含む)に懸適し、さらに30倍希釈し、96we11プレート10%FBJC、100μ1/we11で分注した。

4 8時間後からファイナル(final)3 mMのプロマイシンで選択を開始してウスPD-1発現細胞株を樹立した。

(B) マウスPD-1を強制発現させたA20IIA1.6に対する抗PD

20 -1/抗BCRハイブリッドFab抗体の効果

マウス P D — 1を強制発現させた A 2 O I I A 1. 6を 9 6 we o 1 1プレートに揺縮した (5×10°個/100μL)。抗 P D — 1/抗 B C R ハイブリッド F a b 抗体 (0、1、3、10μg/100μL)を加えて10分後、抗マウス I g G (H+L) F (a b')。(2ymed 社製) (終議度 0.3、1、2 3μg/mL)を100μ1分注して、CO2インキュベーター内(37°C)で12時間培養した。培養上消を回収し、培養上消中のIL — 2の議度をマ

ウス (monse) ILー2アッセイキット (R&G system 製)を用いて割定した。 その結果を図3に示す。 抗PD-1/抗BCRハイブリッドFab抗体及び抗BCR抗体F (a

- b')。の投与量 (dose) を変えて検討した結果、抗BCR抗体F(a b')
- 5 gの改度にかかわらず、全ての場合において、ハイブリッドFiab抗体において抑制効果が見られた。
- (C) SHP-2動員の強認

3×10°cells/100µLのマウスPD-1強制発現A20II

- A1. 6 (B細胞株) に抗PD-1/抗BCRペイプリッドFab抗体 (0,
- 1、3、10μg/100μL)を加えた。10分後、抗マウスI g G (H+L) F (ab')。(格強度 0.3、1、3μg/mL)を100μL添加し、5分間室温で反応させた。遠心して上清を除去した後、細胞を200μLのライシス・パッファ (Lysis buffer) (組成: Tris-HCI (20mM, pH7.4)、NaCI (150mM)、Na2EDTA (1mM)、EGTA (1
- 15 mM)、1%Triton-×100、ピロリン酸ナトリウム (2.5mM)、βーグリセロリン酸ナトリウム (1mM)、N a 3 V O 4 (1mM)、ロイベブテン (1 u g/mL)、PMSF (1mM))に懸濁し、氷上に静置した。30分後、遠心して上清を回収し、20 u LのプロテインGセファロースピーズ (アマシャムバイオサイエンス社製)を加え、4℃で30分間反応させた。遠心しシャムバイオサイエンス社製)を加え、4℃で30分間反応させた。遠心し
- 20 て上浦を回収し、あらかじめ抗FLAG抗体(SIGMA製)を結合させておいたプロテインGセファロースピーズを20μL添加し、4℃で一晩過合させた

ビーズを400μLのライシス・パッファで5回充浄したのち、20μLのライシス・パッファ及び20μLの2×SDSサンブルバッファを添加し、25 100℃で5分間煮消した。遠心によりビーズを除去して、うち15μLを4-20%SDSーポリアクリアミドゲル電気狭動する。除動後、ゲルをブ

ロッティングバッファに置換してから、PVDF膜(BIO RAD製)に転写した。転写後、膜を銘値で1時間プロック・エース(Block Ace)(大日本製薬製)でブロッキングした。

200倍に希釈した抗SHPー2抗体 (SANTA CRUZ 製)を、室温で1時間反応させた後、TBSーTで10分間、3回洗浄した。その後、2000 倍に希釈されたHRP標磁抗ラピット (rabbit) 1g抗体 (アマシャムバイオサイエンス社製)を塩電で1時間反応させた後、TBSーTで10分間、3回洗浄した。最終的にECLプラス・ティデェクション・キット(ECL plus detection bit) (アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて発光させ、ルミノイメー

10 ジャーLAS1000プラス (plus) (FUII Film 製) で解析した。

抗PD-1/抗BCRハイブリッドFab抗体が、抗BCR抗体刺激からのIL-2産生を抑制するという結果から、その効果が、脱リン酸化酵素SHP-2のPD-1のITIMへの動員によるものかどうかを配明するために評価を行った。図4に示すように、PD-1の量をコントロールとし、サ

15 ンプル戯を閲製し、SHP-2の動員を定量した結果、コントローバハイブリッド抗体に対し、1及び10μgにおいて、明らかなSHP-2の動員が確認された。

**英柘例6:抗マウスPD-1 抗体 J 4 3 の c D N A クローニング** 

- 20 (1) 抗マウスPD-1抗体 143の調製
- 37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下、抗マウスPD-1抗体菌生ハイブリドーマ(J
   43)を、Hybridoma SFM 堵地 (インピトロジェン製) で培養し、数日後ハイブリドーマの培養上滑を回収した。回収した培養上清より、HITrap Protein G(アセシャムバイオサイエンス社製)を用いて、I g G 画分を精製した。
- (2) ペプチドシークエンス

ĸ

J431 gGを10-20%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、

ペプチドシークエンサーProcise492(アプライドバイオシステムメ製)を用い た。転写された原をクマシー染色し、J43IgG軽銀を含む膜を切り取り **※勧後のゲルから I g G を P V D F 版 (パイオラッド製) に 転気的に 転写し** 

(3) RNAの謝氏

さらに関製した全R NA (total RNA) より、Oligotex-MAG mRNA Purification kit 溶解した。以下の操作は添付音に従い、全RNA (total RNA) を調製した。 (宝酒造製)を用いて、mRNAを精製した。 5×10。何のくイレリドートや1mlのTRizol (インパトロジェン戦) か

5 (4) 概会 c DNAのクローニング (3, RACE)

3:Full RACE Core Set(宝酒造製)を用いて、以下に示した反応条件により 3' RACEを行った。 (YELTQPPSASVNVGE) より相阻プライャー(プライャー No.1)を設計した。 ペプチドシークエンスにより決定した桰倒のアミノ末鍋の配列

ᅜ

\$'-ta(ch) gs(slg) ct(g/sh/c) sc(g/sh/c) ca(slg) cc(g/sh/c) cc-3' (配列器号 2) プライマー No.1

こ 第1段 (First strand) c DNAの合成

20

担化トグネシウム (25mM) J43 mRNA (50ng/μL)

10×RNA ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) パッファ

AMV 逆転写酵菜(Reverse Transcriptase)XL(5 U/μL)

dNTP 混液 (各10mM)

Oligo dT-3sites Adapter プライマー (2.5 p m o 1/μ L)

25

- リボヌクレアーギ(RNase)阻倍剤(40リ/〃 L)

て、軽倒のアミノ末端の配列15残甚を決定した(配列番号1)。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

30℃ 10分→ 50℃ 30分→ 95℃ 5分→ 4℃ 5分

15 <sub>µ</sub> L 7.5

1			
	2 5	One shot LA PCR Mix(商品名)	0
	2 2	dH <sub>2</sub> O	
	<b>1</b>	アンカープライマー	
	۳	プライマー No.1 (20pmo1/µL)	
	۳	第1億 (First strand) c DNA	

95℃ 5分→(94℃ 20秒、50℃ 20秒、72℃ 60秒)×30サイクル

20 2 定した(配列番号3)。cDNAから推定されるアミノ酸配列を配列表に示 腸菌よりプラスミドを精製して、J43IgG軽鎖cDNAの塩基配列を決 ゲルをEtBr染色した。ゲルからDNA断片を MinElute Gel Extraction Kit 寸(配列番号4)。 れたプラスミドを用いて、大腸菌DH5αを形質転換させた。最終的に、大 回収したDNA所片と pGEM-T Easy Vector (プロメガ製) を連結した。連結さ (キアゲン製)を用いて回収し、DNA Ligation lat ver.2 (宝酒造製)を用いて、 ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物を1%アガロースゲル亀気泳動後、

- (5) 重貫cDNAのクローニング (5'RACE)
- 25 した。S-Full RACE Core Set(宝酒造製)を用いて、以下に示した反応条件により 5'RACEを行った。 報(GenBank Accession No.U17166)に基づき、定常領域のプライマーを設計 5′RACEを行うために、既報のハムスターIgG重銀cDNA配列情

\$	WO 03/011911	PCT/JPn2/07735	WO n3/n11911	PCT/JP02/N7735
		-		
		-	リボヌクレアーゼH (RNaseH)	1
	7510- No.2			76 µ L
	5'-ccc aag agg toa gga gtt gga-3'(5' リン酸化処理)	理) (配列番号5)	30℃ 1時間	
	7540- No.3		反応後、エタノール沈殿を行った。	
~	S'-ug acc agg cat ccc agg gtc-3' (配列番号6)	-	S	
	プライマー No.4		3) ライゲーション(Ligation)反応による一本倒 c D N A の環化	1の戦化
	S'-egt sag ctg gaa ctc tgg agc-3' (配列番号7)		5×RNA(ssDNA) ライゲーション(Ligation)パッファ	<b>∞</b>
	プライマー No.5		40%ポリエチレングリコール (PEG) #6000	2 0
	S'-tgg ttg tgc tgt cac agg cag-3' (配列番号 8)		0,4Hp	1 2
2	プライマー No.6		10 エタノール対際のペアット	
	5'-tgc aca cct tcc cat cdg tcc t-3' (配列番号9)		T4 RNAリガーゼ (ligase)	1
				4 1 µ L
	1) 第1鎖 (First strand) c DNAの合成		15℃ 15時間	
	J43 全RNA (totalRNA) (2μg/μL)	(μ L) . 2		
15	10×RNA ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) パッコ	CR) パッファ 1.5	15 4) 第1回ポリメラーゼ連鎖反応 (First PCR)	
	リボヌクレアーゼ (RNase) 阻害剤 (40U/μL)	$U/\mu L$ ) , 0.5	ライゲーション (Ligation) 反応後のサンブル	-
	AMV 逆転写酵素(Reverse Transcriptase) XL(5 U/μ1	$L(5U/\mu L)$ 1	プライマー No.3 (5pmo1/µL)	7
	プライマー No.2 (100pmo1/μL)		プライマー No.4 (5pmo1/µL)	2
	dH2O	σο	0 H h	20
50		15μL	20 One shot LA PCR Mix(商品名)	2.5
	30℃ 10分→ 50℃ 40分→ 30℃ 2分	2分		50 µ L
			94℃ 3分→(94℃ 30秒、52℃ 30秒、72℃ 120秒)×25サイクル	例×25サイクル
	2) ハイブリッドRNA (Hybrid RNA) の分解	0分解		
	第一段 (First strand) c DNA	15	<ul><li>5) 第2回ポリメラーゼ連鎖反応 (Second PCR)</li></ul>	
22	5×Hybrid RNA 分孫(Degeneration) パッファ	v77 15	25 第1回ポリメラーゼ連鎖反応 (First PCR) 産物	8
	0 H p	4.5	プライマー No.5 (5pmo1/µL)	8

いては、際行権に徐った

(3) 無質および無致のcDNAクローニング

One shot LA PCR Mix (商品名) プライマー No.6 (5 pmo1/#L) 2 5 20

94℃ 3分→ (94℃ 30秒、52℃ 30秒、72℃ 120秒)×30サイクル

-No.7 および No.8 を、また 145-2C11 軽銀可変領域 c D N A配列情報

(GenBank Accession No.AF000356) に基心さ、ベイブリドーマ 145-2C11 軽鏡

No.AF000357) に堪心さ、ベイブリドート 145-2C11 鱼銀耳痰飼枝のプライト

既報の 145-2C11 重債可変領域 c D N A 配列情報 (GenBank Accession

5 回収したDNA所片と pGEM-T Easy Vector (プロメガ製) を連結した。連結さ 示寸 (配列番号11)。 定した(配列番号10)。cDNAから推定されるアミノ酸配列を配列扱に 腸菌よりプラスミドを精製して、J43IgG重鎖cDNAの塩基配列を決 れたプラスミドを用いて、大腸菌DH5 aを形質転換させた。最終的に、大 ゲルをEtBr染色した。ゲルからDNA断片を MinElute Gel Extraction Ki (キアゲン製)を用いて回収し、DNA Ligation kit ver.2 (宝酒造製)を用いて、 ポリメラーゼ単位反応(PCR) 超物を1%アガロースゲル幅気決動後、

狭疱例7:抗マウスCD3 c抗体のcDNAクローニング

2

## (1) RNAの質量

20 ジェン型)で溶解した。以下の操作は際付替に従い、全RNA (total RNA) 珞袋し、数日後5×10°囱のハイブリドータを1mlのTRlzol (インドトロ (145-2C11: Pharmingen 奴)を、Hybridoma SFM 培地(インパトロジェン戦)の 37℃、5%COa条件下、抗マウスCD3 ε 抗体磁生ハイブリドーマ

# (2) cDNAライプラリーの存取

を関数した。

23 いて、ハイブリドー々(145-2CII)から始出した全RNA (total RNA) 2.5 μ Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (アマシャムファルマシア製) を用

gから、オリゴ d T プライム法により c D N A を作製した。操作・手頃につ

5

行った。

cDNAライブラリーを鋳型とし、これらのプライマーを用いて、PCRを  **| 四条資味のプライマーNo.9 およびNo.10 を設計した。 ペイプリドーマ 145-2C11** 

S'-tga gga gac ggt gac cat ggt t-3' 5'-gag gtg cag ctg gtg gag tct-3' (配列番号12) プライヤー No.7 プライマー No.8 (配列番号13)

2 プライマー No.9

5'-gac atc cag atg acc cag tet c-3' (配列番号14)

プライマー No.10

5'-ttt gat ttc cag ctt ggt gcc ag-3' (配列番号15)

23 8 One shot LA PCR Mix (商品名) プライマー No.8 または 10 (5 pm o 1/4 L) プライマー No.7 または 9 (5 pm o 1/4L) cDNAライプラリー 2 5 20 ю 0

<u>చ</u>

(94℃ 30秒、52℃ 30秒、72℃ 120秒) ×30サイクル

PCT/JP02/07735

WO 03/011911

PCT/JP412/417135

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)産物を1%アガロースゲル電気於動後、

ゲルをEtBr染色した。ゲルからDNA断片を MinElute Gel Extraction Kit (キアゲン製) を用いて回収し、回収したDNA断片を DNA Ligation kit ver.2 (宝酒造製)を用いて pGBM-T Easy Vector (プロメガ製) に連結し、DNA Ligation kit ver.2 (宝酒造製)を用いて、回収したDNA断片と pGBM-T Easy Vector (プロメガ製) を連結した。連結されたプラスミドを用いて、大腸菌DH5 αを形質転換させた。最終的に、大腸菌よりプラスミドを精製して、DNAの塩基配列を決定し、GenBank Accession No.AF000357 および GenBank

10 Accession No.AF000356 と同一の配列であることを強認した。

実筋例8:143-2C11 パイスペシフィック抗体発現プラスミドの構築

J 4 3 I g G 重戦 c D N A と 145-2Cll I g G 軽鎖 c D N A をリンカー No.1, No.2 およびブライマー No.11, No.12 を用いてポリメラーゼ連鎖反応(P 15 CR)により連結して、フラグメント 1 (図5参照)を作製した。次に 145-2CII 1 g G 監鎖 c DN A をリンカー No.3、No.4 およびプライマー No.13、No.14 を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) により連結して、フラグメント 2 (図 5参照)を作製した。145-2CII 1 g G 直鎖 c DN A と J 4 3 1 g G E を G c DN A を リンカー No.5、No.6 およびプライ

20 マー No.15、No.16を用いてポリメラーゼ連級反応 (P.C.R.) により連結して、 フラグメント 3 (図5参照)を作製した。

プライマー No.11

S-tit gas itc aga ggt gcg gct icd gga gitc t-3' (配列番号16)

25 プライマー No.12

5'-gat cag gag ctt agg agc ttt cc-3' (配列番号17)

æ

プライマー No.13

5'-cag gcc agt cag gac att agc aa-3' (配列番号18)

プライマー No.14

S'-taa tgt atg cga ccg act cca gc-3' (配列番号19)

プライマー No.15

5'-tga ggc ctc tgg att cac ctt ca-3' (配列番号20)

プライマー No.16

S'-aaa aaa aaa ctc gag gac cta gga cgg tga gct ggg t-3' (配列番号21)

10 リンカー No.1

5'-agggacccaagtcactgtctctcaggtggaggcggttcagacatccagatgacccagtclccat-3' (配列番

号22)

リンカー No.2

5-tccctgggttcagtgacagaggagtccacctccgccaagtctgtaggtctactgggtcaggga-3' (配列番

15 号23)

リンカー No.3

5'-acctggcaccaagctggaaatcaaaggtggaggcggttcaggcggaggtggctctggcggtggcggatcggaggt

gcagctggtggagtdgggg-3' (配列番号24)

リンカー No.4

20 S-tggaccgtggttcgacctttagttccactccgccaagtccgcctccaccgagaccgccaccgcctaggcdccacgtc gaccacctcagacccc-3' (配列番号25)

リンカー No.5

5'-aggaaccatggtcacogrctcaggtggaggcggttcatatgagctgactcagccaccttcag-3'

(配列番

号26)

25 リンカー No.6

5-tecttggtaccagtggcagaggagtccacctccgccaagtatactcgactgagtcggtggaagtc-3' (配列番

PCT/JPu2/07735

母27)

第1回ポリメラーゼ連鎖反応 (First PCR) レラグメント1、2、3のPCR保件

テンプレート (Template) 1 テンプレート (Template) 2

リンカー (100ng/µL) リンカー (100ヵg/μL) 17 N

ة .

One shot LA PCR Mix (商品名)

50 # L

2 5

95℃ 5分→ (94℃ 30秒、40℃ 30秒、72℃ 60秒) ×20サイクル

第2回ポリメラーが単位反応(Second PCR)

5 第1回ポリメラーゼ選與反応 (First PCR) 産物 プライター (5 pm o 1 / # L) One shot LA PCR Mix (商品名) プライター (5 pm o 1 / # L) 25 16

95℃5分→ (94℃30秒、50℃30秒、72℃60秒)×30サイクル

20

23 EcoR I・Xho Iを用いて消化し、1%アガロース電気泳動を行った後、DNA 断片を MinElute Gel Extraction Kit を用いてゲルから特製した。次に、この3個 ジーン製)をそれぞれ、態限廢索 EcoR I・Kpn I、Kpn I・Sph I、Sph I・Xho I、 DNAフラグメント1、2、3とプラスミド pBluescriptII SK(+) (ストララ

WO 03/011911

PCT/JP02/07735

塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列按に示す(配列番号29)。 pBluescriptII SK(+)を調製し、挿入部分の植基配列を確認した(配列番号28) 大腸菌DH5αを形質転換した。大腸菌よりプラスミド J43-2CllscDb のフラグメントとプラスミド pBluescriptII SK(+) (ストラテジーン製) を DNA Ligation kit ver.2(宝酒造製)を用いて連結し、連結されたプラスミドを用いて

ᅜ 5 列表に示す (配列番号31)。 断片と連結した pSecTag2/Hygro B を再び制限酵素 BamH I で切断し、もう一方 列を確認した(配列番号30)。塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配 pSecAygro B を調製し、作製した 143-2C11 パイスペシフィック抗体の塩基配 5 α を形質転換した。 最終的に、 大腸菌より プラスミド 143-2C11scDb の BamH I-BamH I 断片と連結した。連結したプラスミドを用いて大腸菌 D H BamH I-Xho I 断片を BamH I および Xho I で切断した哺乳動物細胞発現用ベク 切断されてできた BamH I-Xho I断片と BamH I-BamH I断片のうち、最初に ターpSecTag2/Hygro B(インドトロジェン製)と連結した。次に BamH I-Xho I I43-2C11scDb-pBluescriptII SK(+)を制限酵素 BamHI および XhoI で切断し、

実施例 9:J43-2C11 バイスペシフィック抗体の発夷

8 描稿した。翌日、細胞を10mLのDMEMで洗浄した後、LipofectAMINE-Lの40%ウシ胎児血清を含むDMEMを添加した。2月目に細胞を10m plus を用いて 143-2C11scDb-pSec/hygro B を遺伝子導入した。 3時間後、 5 m LのDMEMで洗浄して新たな20mLのDMEMを添加し、4月目に培養 DMEM)に懸菌し、Type Ic コラーゲンをコートした150mmディシュに 6×10。個の293下細胞を20mLの培地(10%ウシ胎児血清を含む

23 透析チューブにいれ40% PEG20000を含むPBS中で透析し、濃縮した。 遠心により細胞を除去後、0.22μmPVDFフィルターを通した。上滑を、

微箱した上滑を HTrap chelating HP column(アマシャムファルマシア製)を用いて構製した。さらに、精製度を高めるために Hiprep 16/60 Sephacryl S-200 High

Resolution(アマシャムファルマシア製)を用いて、ゲルる過精製した。

5 実施例10:丁細胞の活性化の抑制

BALB/cマウスから膵臓を摘出後、膵臓をセルストレイナー (70μm Nyron)を通して細胞を閲覧した。闘製した細胞を遠心して回収後、溶血ベッファー [NH4C1 (0.8%)、KCO。(0.1%)、EDTA (1mM)]を加え、赤血球を溶血させた。その細胞をPBS (一)で1回洗浄後、mouse

10 CD3T cell errichment column kit(R&D 製)を用いて工部胞を構製し、5×10°個/mLの割合で培地(10%ウシ胎児血清を含む PRAMI640)に懸濁した。 子め 5 μ g/m Lの抗CD 3 抗体(クローン名 K T 3)を37℃で3時間コートした9 6 w e 11プレートに、先に腐製したT細胞を2×10°個/100 μ L/w e 11の割合で指摘し、さらに培地で希釈した 143-2C11 バイスベ

15 シフィック抗体(0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 μ g/100 μ L)を添加して、3 7℃、5%CO2条件下で7.2時間培養した。7.2時間後、培養上清を回収し上済中の1 FN-rの養度をQuantisine Immunoassay Kit(R&D 製)を用いて定量した。

図らに示すように、143-2C11 パイスペシフィック抗体はインビトロ (in vitro) 20 において活性化させたマウス障礙T細胞の商生する1FN-rの量を用量依存的に減少させた。

WO 03/011911

PCT/JP02/07735

## 觀状の範囲

PD-1を認識する物質、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質およびリンカーからなる物質。

8

2. PD-1を認識する物質、PD-1が発現している細胞膜に存在する膜タンパクを認識する物質およびリンカーからなる2価物質である静水の箱田1に記載の物質。

10 3. 膜タンパクが、T細胞膜またはB細胞膜に存在するタンパクである閉状の範囲1または2配載の物質。

4. PD-1を認識する物質、T細胞受容体複合体を構成するタンパクを認識する物質またはB細胞受容体複合体を構成するタンパクを認識する物質

15 およびリンカーからなる請求の範囲1または2記載の物質。

5. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々2から5量体である請求の範囲1乃至4のいずれかに記載の物質。

20 6. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質の片方あるい は両方が抗体である静水の範囲1乃至5のいずれかに記載の物質。 7. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質の片方あるい は両方が、抗体のFab部分である請求の範囲6のいずれかに配娘の物質。

22

8. リンカーが有機化合物からなる請求の範囲1乃至5のいずれかに記載の物質。

38

- リンカーがペプチドからなる蔚水の範囲 1 乃至 5 のいずれかに記載の
- **チドである請求の範囲1万至5のいずれかに記載の物質。** 10. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々ペプ
- 囲1万至5のいずわかに記載の物質。 の瓜供可変領域と軽供可変領域を含む複数のペプチドで構成される請求の領 11. PD-1を認識する物質およびタンパクを認識する物質が、各々抗体

5

- 各々ペプテドである諸求の範囲1乃至5のいずれかに記載の物質。 12. PD-1を認識する物質、タンパクを認識する物質およびリンカーが、
- 13. 請求の範囲1に記載の物質を、PD-1が関与する疾患の治療および
- 7 /または予防に有効な宣含有する聚學的組成物。
- 組成物。 び感染症からなる群から選ばれる疾患である請求の範囲13に記載の薬学的 14.疾患が神経変性疾患、自己免疫疾患、陰器移植片拒絶反応、腫瘍およ

20

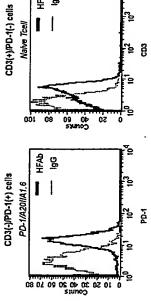
- 病からなる群から選ばれる精束の範囲1.4に記載の薬学的組成物。 ン院、 トツャドジュセフ病、 筋萎縮性回氣原化症、クロイツ フェルトヤコナ 15. 神猫疫苗疾患が、パーキソンン疫、パーキソンン症候群、ベンチント
- 25 16. 自己免疫疾患が、糸球体腎炎、関節炎、拡張性心筋症療疾患、積疡性 大腸炎、シェーグレン症候群、クローン病、全身性エリディトーデス、慢性

39

囲14に記載の薬学的組成物。 存性糖尿病、ベーチェット病および橋本病からなる群から超ばれる請求の領 炎、強皮症、結節せい動原周囲炎、リウマチ點、尋常性白斑、インスリン依 関節リウマチ、多発性硬化症、乾餅、アレルギー性接触性皮膚炎、多発性筋

PCT/JP02/07735

24



HFAb ρg

> 8 Ø

0.5 μ g/ml α-CD3mAb atimulation only 5 µ g/ml α-CD3mAb stimulation only

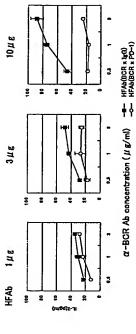
 $0.5\,\mu\,\mathrm{g/ml}$   $\alpha$ -CD3mAb etimulation + HFAb(CD3 x PD-1)  $0.5\,\mu\,\mathrm{g/ml}$   $\alpha$ -CD3mAb stimulation + HFAb(CD3 x IgG)  $5\mu\,g/m!$   $\alpha$ -CD3mAb stimulation + HFAb(CD3 x PD-1)  $5\mu\,g/m!$   $\alpha$ -CD3mAb stimulation + HFAb(CD3 x  $\lg G$ )

WO 03/011911

PCT/JP02/07735

က

X



BCR x PD-1 Hybrid Fab antibody (μg) 0 1 3 10 1 3 BCR x 1g6

SHP-2 P0-1 the rather influence received the safety with Blot: a-SHP-2 Halling part and an article and a second an Blot: a-FLAG

IP: A-FLAG

2/3

WO 03/011911 PCT/JP02/07735

X တ

EcoR I J43VH 2C11VL Fragment 1 J43-2C11scDb-pSec/bygro B Kpn I 15 04 2C11VH J43VL Sph I Frugment 3 B Xho I

屡 6

IFN- 7 (pg/ml) 10000 12000 14000 8000 2000 4000 6000 0 . 2 0.03 0.1 0.3 BsAb( *µ* 9)

WO 03/011911

PCT/JP02/07735

SEQUENCE LISTING

<110> ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. HONJO, Tasuku

<120> Substances which specifically recognize PD-1

<130> ONF-4210PCT

<150> JP P2001-232303 <151> 2001-07-31

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<221> 15
<2212> PRT
<212> PRT
<213> Vus musculus

**<400>** 1

Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu I

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220)

(223) Designed DNA based on amino terminal sequence of monoclonal antib ody J43 light chain to act as a degenerated primer

<220>
<221> misc\_feature
<222> (9)..(9)
<223> n=a, t, c or g

(220) (221) misc\_feature (222) (12)..(12) (223) n=a, t, c or g

3/3

P.	r Val Asp Ser Asp Ser Lys 95 c acc gtc cta ggt gga ccc u Thr Vel Leu Gly Gly Pro	a cet tea cet gag gag ete o Pro Sar Pro Glu Glu Lau 125	g gtt mat gac ttc tac cog ı Val Asn Asp Phe Tyr Pro 140	t gga gca act atc aat gat n Gly Ala Thr Ile Asn Asp 155	g ggc cae eac tec atg acc n Gly Cln Asn Tyr Wet Thr 175	g tgg asa tct cac sac egg n Trp Lys Ser His Asn Arg 190	a act gig gag aag egt tig # Thr Val Glu Lys Ser Leu 205	tititct tagcccagga	ctcta ttctatcaat ctcaascctt tagt taatcaaaaa aasaaaaaa			
WO 13/111911	Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val Asp Ser Asp Ser Lys 85 90 95 ttg tat gtt ttt ggc agc gga acc cag ctc cta ggt gga ccc Leu Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gly Pro 100	asg tot tot occ ans gto acs gig tit ocs oot tos oct gag gag oto Lys Ser Ser Pro Lys Val Thr Val Phe Pro Pro Ser Pro Glu Glu Leu 115 125	ogg aca aac aaa goc aca cig gig igt cig git aai gac iic iac cog Arg Thr Asn Lys Ala Thr Lau Val Cys Lou Val Asn Asp Phe Tyr Pro 130 140	ggt tot goa aca gig acc tgg aag goa aat gga goa act atc aat gat Gly Ser Ala Thr Vel Thr Trp Lys Ala Aen Gly Ala Thr Ile Aen Asp 145 150	ggg gig ang act ach ang cet tee ann eng gge enn mae the aig ace Gly Val Lya Thr Thr Lya Pro Ser Lya Gln Gly Cln Asn Tyr Wai Thr 170 175	ago ago tao ota agt ttg aca goa gao cag tgg asa tot Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gin Trp Lys Ser 180	git too igo caa git aco cai gaa ggg gaa aci gig gag aag agi iig Val Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Glu Thr Val Glu Lya Ser Leu 200	toc cet ges gas tgt etc taggageces gtettttet tagecesga Sar Pro Ala Glu Cys Lsu 210	agectggage taegggacec agaatgtggt etteteteta ttetateaal eteaaecit etgetettae eesetgagta ttesstaasg tatesttagt tastessaasa aasaasaas	всавав	(210) 4 (211) 214 (212) PRT (213) Mus musculus	(400) 4
PCT/JP02/07735		20					48	96	144	192	240	288
							tet gag ctg act cag cca cct tca gca tca gtc aat gta gga gag act Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Cly Glu Thr I 5	gte asa ate ace tge tet ggg gae caa ttg eeg saa tat itt ges gat Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Pro Lys Tyr Phe Ala Asp 20 30	tag ttt cat cas agg tca gac cag acc att ttg caa gtg ata tat gat Trp Phe His Cln Arg Sor Asp Cln Thr Ile Leu Cln Vel Ile Tyr Asp 35 46	gat mat aag cgc ccc tog ggg atc cct gam aga atc tct ggg toc ago Asp Asm Lys Arg Pro Sor Gly lie Pro Glu Arg lim Ser Gly Ser Ser 50 60	tea ggg aca aca gcc acc ttg acc atc aga gat gtc cgg gct gag gat Ser Gly Thr Thr Ala Thr Lau Thr Ile Arg Asp Val Arg Ala Glu Asp 65 76 80	gas ggt gac tat tec tgt ttc tcs ggs tat gtt gat sgt gat egc ome
WO 03/011911	(220) (221) misc_feature (222) (18) (18) (223) n=e, t, c or g	(400) 2 taygarctna cncarcence	(210) 3 (211) 798 (212) DNA (213) Mag maggallis				tst gag ctg act cag cca Tyr Glu Leu Thr Gln Pro 1	gtc asa atc acc tgc tct Val Lys Ile Thr Cys Ser 20	tgg ttt cat caa agg tca   Trp Phe His Gln Arg Sor   35	gat aat aag cgc ccc tog a Asp Asn Lys Arg Pro Sor ( 50	tca ggg aca aca gcc acc Ser Gly Thr Thr Ala Thr   65	gas ggt gac tat tac tgt

PCT/JP02/07735

$\geq$
×
v

Tyr Clu Leu Thr Cin Pro Pro Sar Ala Sar Vel Asn Vel Cly Clu Thr 1 5 10

Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Cln Leu Pro Lys Tyr Phe Ala Asp
20 25 30

Trp Phe His Gln Arg Ser Asp Gln Thr Ile Leu Gln Val Ile Tyr Asp 35 40 45

Asp Ass Lys Arg Pro Ser Gly IIe Pro Glu Arg IIe Ser Gly Ser Ser 50 60

Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val Asp Ser Asp Ser Lys 85 90 95 Sor Cly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Vel Arg Ala Glu Asp 65 70 75 80

Leu Tyr Val Pho Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gly Pro \$100\$

Lya Ser Ser Pro Lya Val Thr Val Phe Pro Pro Ser Pro Glu Glu Leu 115 120 125

Arg Thr Asn Lys Alo Thr Lou Val Cys Leu Val Asn Asp Phe Tyr Pro  $130\,$ 

Gly Sor Ala Thr Val Thr Trp Lys Ala Asn Gly Ala Thr Ile Asn Asp 145 150 150 160

Gly Val Lys Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Gly Gln Asn Tyr Met Thr  $165\,$   $170\,$ 

Ser Ser Tyr Lou Ser Lou Thr Ala Asp Gln Trp Lys Ser His Asn Arg 180 185

4/24

PCT/JP02/07735

WO 03/011911

PCT/JP#2/#7735

Val Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Glu Thr Val Glu Lys Ser Leu 195 200 205

Sar Pro Ala Glu Cys Leu 210

<220>
<221> modified\_base
<221> (1).. (1)
</223> phosphorylated

**<400>** 5

cccaagaggt caggagttgg a

21

(210) 6 (211) 21 (212) DNA (213) Cricetulus migratorius

(400) 6 ttgaccaggc atcccagggt c

21

(210) 7
(211) 21
(212) DNA
(213) Cricetulus migratorius

cgtaagctgg aactctggag c (400) 7

21

 (210) 8

 (211) 21

 (212) DNA

 (213) Cricetulus migratorius

. . . . . .

5/24

WO 03/011911	Phe Ser Asp Tyr Phe Met Ser Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly 30 35	ctg gag tgg gtt gct cac ata tac acg aaa agt tat aat tat gca act Leu Glu Trp Yal Ala His lie Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr 50 55	tat tac tcg ggt tog gtg aaa ggc aga ttc acc atc tcc aga gat gat Tyr Tyr Ser Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ila Ser Arg Asp Asp 60 65	toc ogs age atg gto tac otg cas atg sac asc otg ags act gag gac Ser Arg Ser Wet Val Tyr Leu Gln Wet Asn Leu Arg Thr Glu Asp 75 75	acg goc act tat tac tgt aca aga gat gga agc gga tat ccc tct ctg Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Lou 100 105	gat tto tag ggt caa ggg acc caa gto act gto too toa gco aca aca Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Cln Val Thr Val Ser Ser Ala Thr Thr 110 115	aca gco cca tct gtc tat cco ttg gco cct gco tgt gao ago aca acc Thr Ala Pro Sar Yal Tyr Pro Lau Ala Pro Ala Cys Asp Sar Thr Thr 125 130	asa tog Lys Sar 140	(210) 11 (211) 161 (212) PRT (213) Nus musculus (400) 11	Met Gly Leu Gly Leu Gln Trp Val Phe Val Ala Leu Lou Lys Gly -20 -10	Val His Cys Glu Val Arg Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys -5 -1 1 5 10	Pro Glu Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Vel Ale Ser Cly Phe Thr Phe
PCT/JP02/07735	. 21		22						cagcactgaa aacaagacca 60 t gtt gct ctt tta aaa 110 is Yal Ala Leu Lus -10	ggt gga gga tta gtg 158 Cly Cly Cly Lau Yal 10	gcc tot gga tto acc 206 Ala Ser Cly Phe Thr 25	get cea ggg ang ggg 254
WO 0.3/0.11911	tegitgiget gicacaggea g	(210) 9 (211) 22 (212) DAA (213) Gricetulus migratorius		(210) 10 (211) 648 (212) 104	(215) will muscutus (220) (221) ms		<pre>(221) sig_peptide (222) (66). (128) (223)</pre>	<pre>&lt;220&gt; (221&gt; mat_peptide (222&gt; (129) (648) &lt;223&gt;</pre>	(400) 10 .  ### ### ###########################	88t gto cac tgt gag gtg ogg ctt ctg gag tct gg Gly Val His Cys Glu Val Arg Lau Luu Glu Sar Cl -5 -1 1 5	esg oot gag ggg toa otg aaa oto too tgt gtg go Lys Pro Glu Gly Sar Leu Lys Leu Sar Cys Val Al 15	tto agt gae tat tte atg age tgg gte ege cag ge

		<210> 13		goggtgebge tagtggbgte t 21	(400) 12		(212) DNA	21 (0) 12		***	Ser 140		125 130 135	Ale Pro Sar Vel Tyr Pro Leu Ale Pro Ale Cys Asp Sar Thr Thr Lys		;	110 115 120	Pho Tro Gly Glo Gly Thr Glo Val Thr Val Ser Ser Ale Thr Thr	95 . 100 105	Alb Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp			ATS SOT NOT VEL TYT LEU GIN NOT ASN ASN LEU ATS INT GIU ASP INT		60 65 70 75	Twr Ser Gly Ser Yel Ive Gly Are Pho Thr Ile Ser Are Aso Aso Ser	45 50 55	Glu Iro Val Ala His Ila Tyr Thr Lys Sor Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr	30 36 40	Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro		;	15 20 25		WO 03/011911 PCT/JP02/07735	
caggocagte aggacattag cas	<400> 18			⟨210⟩ 18		gatcaggage ttaggagett tee	(400) 11	(213) WILL BUSCULUS	(212) TANA	(211) 29		ttigaatica gaggigoggo ttoiggagio t	<b>(400)</b> 16		<213> Mus.musculus		(211) 31			<400> 15	CELLY BITS MICHTAIN	(919) Itis manufus	(211) 23			cancerroses reservoyers to		(212) DNA			trorresponding tt				WO 03/011911	
23						22	3					21							23							22					22				PCT/JPu2/07735	

8/24

9/24

WO 03/011911	PCT/JP42/n7735	WO 113/111911 PCT/JP1/3
		<pre>&lt;220&gt; &lt;223&gt; Designed DNA to act as a linker between the beavy chain of J43 an d the light chain of 145-2011</pre>
(212) DNA (213) Nus musculus		(400) 23 tocotagate agastocaco tocaccaast otatagatet actagateag 60
(400) 19 taatgtatge gacegaetee age	23	
<pre>&lt;210&gt; 20 &lt;211&gt; 23 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Mus musculus</pre>		(210) 24 (211) 95 (212) DVA (213) Artificial Sequence
(400) 20 tgagcetet ggatteacet tea	23	(220) (223) Designed DNA to act as a linker between the beavy and light chain s of 145-2011
		ittes ggeggagig gotetggegg
(2)3> Mus musculus (400) 21 sasasanan treseent semicates enteret	26	tegregatos gaggigango tegregagio tegges 95
(210) 22 (211) 65		.210/ 25 (211) 95 (212) DNA (213) Artificial Sequence
		<pre>&lt;223&gt; Dasigned DNA to act as a linker between the heavy and light chain s of 145-2C11</pre>
(220) (223) Designed DNA to act as a linker between the beavy chain of J43 an d the light chain of 145-2011	43 sn	(400) 25 trgacctit agittecace teegecaagt cegeetecae egagacegee 60
<400> 22 aggaccea gteacifict ceteaggigg aggeggitea gacatecaga igacceagic	09	acegratage atosacetes accac
tccat (210) 23	99	(210) 26 (211) 65 (212) DNA (213) Artificial Sequence
<pre>&lt;211&gt; 65 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; Artificial Sequence</pre>		<pre>&lt;220&gt; &lt;223&gt;     Designed DNA to act as a linker between the heavy chain of 145-2C</pre>

PCT/JP02/07735

	WO 03/011911	

WO 03/011911

PCT/JP02/07735

192

11 and the light chain of J43

gga cct ggc acc mag ctg gam atc mam ggt ggm ggc ggt tem ggc gga Gly Pro Gly Thr Lys Lau Glu Ila Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 235 230 235 att Ile cag stg acc cag tot coa toa toa otg cot goo too otg gga gac aga Gln Wet Thr Gln'Ser Pro Ser Ser Lau Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg 130 cam ggg acc cam gtc act gtc tec tea ggt gga ggc ggt tea gac atc Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile 115 120 tac tgt aca aga gat gga agc gga tat ccc tct ctg gat ttc tgg ggt Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp Phe Trp Gly 100 105 gto tac ctg cam atg ame ame ctg aga act gag gac acg gcc act tat
Yal Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
85
90
95 tog gig ann age age ite ace ate tee aga gat gat tee ega age atg Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ilo Sor Arg Asp Asp Ser Arg Ser Wat 55 70 80 got one ata the acg ama agt that and that god not that the tog ggt Alm His Ile Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Alm Thr Tyr Tyr Ser Gly 50 60 tot ggg aga gat tot tot the set ate age age egg ega toe gam gat Ser Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp 195 200 aca aat aaa ttg gca gat gga gtc cca tca agg ttc agt ggc agt ggt Thr Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly 180 185 gtc act atc eat tgt cag gcc agt cag gac att agc aat tat tta aac Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn 145 160 tgg tac cag cag asa cca ggg asa gct cct aag ctc ctg atc tat tat Trp Tyr Gln Cln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Lau Lau Ila Tyr Tyr 165 170 ggs tot tat tac tgt cas cag tat tat asc tat cog tgg scg tto Gly Ser Tyr Tyr Cys Gla Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe 210 225 576 288 240 720 672 624 528 **8**8 432 384 336

PCT/JP02/07735	
WO n3/n11911	

WO 03/011911

768	816	864	912	960	1008	1056	1104	1152	1200	1248	1296
ggg Gly	gcc Ala	get Ala	att Ile	aga Arg 320	Ser	sat Isn		gag Glu	fica Ala 400	tat Tyr	2 1
Ser 255	888 61u	cag Gln	Ser	Ser	ang Lys 335	388 Y	88c 8	GBB B	# # # # # # # # # # # # # # # # # # #	ata t Ile T 415	88 4 th
gag Glu	tgt Cys 270	Ars	Ser	gtc	3 E	gac ( Asp [ 350	133 g	gta gga Val Gly (	r at	tg E	1 th
stg Val	Ser	gtc Val 285	Ser as	2 <del>1</del>	le l	<b>8 P</b>	88t 8 Cly 0 365	St P	ys T	88 g In V.	5 C
ctg Leu	Cer ct	13 ts	act agt agt agt Thr Ser Ser Ser 300	ttc acc gtc tcc aga Phe Thr Val Ser Arg 320	San J	Sp 1	tca ggt gga Ser Oly Gly 365	gtc a Val A 380	8 C	0 0 0 0	33 8
EGT 8gc 6ga tcg grg cag ctg gtg gag tct ggg Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Lau Val Glu Sar Gly 245 255	cag cot ggs aag toc otg aaa oto too tgt gag Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu 265	ggo tat ggo atg cac tgg gto cgo cag got Cly Tyr Cly Wot His Trp Val Arg Cln Ala 280	ctg gag tog gto gca tec att act agt agt agt Leu Glu Ser Val Ala Tyr Ila Thr Ser Ser Ser 295		anc tta ctg ttt cta caa atg amc att ctc emg Am Leu Leu Phe Leu Gln Wet Asn Ile Leu Lys 325 330	gcc sig tac tac igt gcs aga itc gac igg gac sas asi Ale Wei Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn 340 350	Ser S	gce tca gtc set Ale Sor Vel Asm 380	tgc tct ggg gac caa ttg ccg aaa tat ttt gca Cys Sar Gly Asp Gln Leu Pro Lys Tyr Phe Ala 390 ags	cas agg tos gac cag acc att ttg cas gig ata tat Gin Arg Ser Asp Gin Thr Ila Leu Gin Vai Ila Tyr 405 415	38 38
gtg Val 250	ctg Leg	atg Mot	r F	38c	caa ( Glu )	88 7	F. C.	Ce t	la L 3	acc a Thr I.	5 6
gag Glu	Ser 265	gge a	tog gto goa tao att Ser Val Ala Tyr Ile 295	gct gac gct gtg ana ggc cgg Ala Asp Ala Val Lys Gly Arg 310	en Sta	gca a Ala A 345	양찬	er A	5 5 5 5	gac cag acc Asp Gln Thr 410	2 6
Ser	Sag.	177 280	atc /al	1. Tag	# # E	Y at	gtc a Val T 360	act cag cca cct tca Thr Gin Pro Pro Ser 375	88 8 Ly A	26	26 ×
61y	sgs Cly	586 51y	teg   Ser   295	is t	itg t	7. 2	1 4 8 4 8	Pro P. 375	4 H	8 4	8 5
88c 61y	P Ct	380	388	88c ( Asp / 310	2 2	3 t T	5 H	ag c	tge t Cys S 390	ces sgg tos Gln Arg Ser 405	o ii Se tt
88t 88c Gly Gly 245	gg glu	£ #	ctg gag Leu Glu	get gac Ala Asp 310	Bac t Asn L 325	tg t	88 a 1y T	4 H	2 C 8	ces 25 Cln A1 405	5 K
317	gt 8 Val (	2 7		# H	8 X X	gcc a Ala M 340	8 5	26.56 9.05	ă <b>‡</b> ≐	# 8 # 22 €	8 C8
68's ggc tot ggc Gly Gly Ser Gly	gea ggc ttg gtg cag cct gga aag tcc ctg aaa ctc tcc tgt gag gcc Gly Gly Lau Val Gln Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala 265 270	888 ttc acc ttc agc ggc Gly Phe Thr Phe Ser Gly 275	688 agg ggg Gly Arg Gly 290	atc ass tat Ile Lys Tyr	gec sat gcc aag anc tta ctg ttt cta caa atg aac att ctc ang Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Cln Wet Asn Ile Leu Lys 325 330	gec aca gcc atg tac tac tgt gca aga ttc gac tgg gac asa aat Asp Thr Ala Net Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn 340 350	tec tag age caa aga acc atg gtc acc gtc tcc tca agt aga age agt Tyr Trp Gly Cln Gly Thr Wet Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly 365 365	tat gag ctg act cag cca cct tca gos tca gtc sat Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn 370 380	gtc asa stc acc tgc tct ggg gac caa ttg ccg asa tat ttt gca Val Lys Ila Thr Cys Sar Cly Asp Gla Leu Pro Lys Tyr Phe Ala 390 395	gat tgg ttt cat Asp Trp Phe His	gat gat aat aag ogc occ tog ggg atc oct gaa aga atc tot ggg toc Aap Asp Aan Lys Arg Pro Ser Gly Ila Pro Clu Ara Ila Sar Cly Sar
Gly Ser	88a 8gc ttg Gly Gly Leu	ige t	688 a Gly A 290	t La	st s	gac aca Asp Thr	8 E	# F 5	3 7	3 tt	t aa p As
61y (	9 5	tet gga Ser Gly	cca g Pro G 2	aat a Asn I 305	s ≪.	888 81 Glu At	tac tgg Tyr frp	tca tat Ser Tyr 370	act st Thr Va 385	gat tgg Asp Trp	gat gat Asp Asp

14/24

Pro Gly Arg Cly Leu Clu Ser Val Ala Tyr IIe Thr Ser Ser Ser IIe 290 295 300

Cly Cly Lou Val Cln Pro Cly Lys Ser Leu Lys Leu Ser Cys Clu Ala 265 270 Cly Pro Cly Thr Lys Lau Clu Ila Lys Cly Cly Cly Cly Ser Cly Cly 225 230 235 240 Val Thr Ila Asn Cys Gla Ala Sar Gla Asp Ile Sar Asn Tyr Leu Asn 145 150 150 ş Oln Cly Thr Gin Val Thr Val Sor Sor Cly Cly Cly Cly Ser Asp Ile 115 120 125 Oly Cly Sor Oly Cly Cly Cly Sar Clu Val Cla Leu Val Glu Sor Cly 245 250 255 Ser Cly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Clu Ser Clu Asp 195 200 205 | 116 Oly Sar Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr Phe 210 215 220 쿧 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr 176 176 Asa Not Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg 130 135 Cys Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp Phe Trp Gly
100 105 110 Lys Lou Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Pho Ser Gly Ser Gly 180 185

Asp Glu Cly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val Asp Ser Asp Ser 450 450 Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Val Arg Ala Glu 435 440 445Asp Trp Phe His Cln Arg Ser Asp Cln Thr Ile Leu Cln Val Ile Tyr 405 410 415 The Val Lys IIe The Cys Ser Cly Asp Gln Leu Pro Lys Tyr Phe Ala 385 390 395 400 Ser Tyr Clu Leu Thr Cln Pro Pro Ser Ala Ser Vel Asn Val Cly Glu 370 380 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly 355  $$360\ \ \, 365$ Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn 340 345 Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe Leu Gln Wet Asn Ile Leu Lys Ser 325 330 Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val Lys Cly Arg Phe Thr Val Ser Arg 305 310 310 Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Cly Ile Pro Clu Arg Ile Ser Cly Ser 420 425

Sor Gly Phe far Phe Sor Gly Tyr Gly Met His Typ Val Arg Gln Ale  $276 \ \ \, 280 \ \ \, 285$ 

Lys Leu Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly 465 470

WO 03/011911	PCT/JPu2/n773S	WO 03/011911	PCT/JP02/07735
(210) 30 (211) 1656 (212) DWA (213) Artificial Semience		ate tec acg aam agt tat aat tat gca act tat tec tog ggt tog gtg lle fyr Thr Lys Ser Tyr Asm Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ser Gly Ser Val 80	336
		asa ggo aga tto aco ato too aga gat gat too oga ago atg gto tao Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Ser Wel Tyr 95 105	384
(220) (221) CDS (222) (1) (1656) (223)		ctg caa atg aac eac ctg ega act gag gac ecg gcc act tat tec tgt Leu Gin Wet Asn Asn Leu Arg Thr Giu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys 110 115	432
(220) (221) sig_peptide (222) (1) (63)		aca aga gat aga ago aga tat coc tot otg gat tto tag ggt caa ggg Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp Pho Trp Gly Gln Gly 125	480
(223) (220) (221) mat_peptide		acc caa gtc act gtc tco tca ggt gga ggc ggt tca gac atc cag atg Thr Gln Val Thr Val Scr Scr Gly Gly Gly Gly Scr Asp Ile Gln Met 140 155 150 150 150 150	528
		acc cag tct cca tca ctg cct gcc tcc ctg gga gac aga gtc act Thr Gla Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr 160 160 165	576
stg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctc tgg gtt cca Wet Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro -20 -16	48	atc eat tgt cag gcc agt cag gac att agc ant tat tta aac tgg tac lle Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp lle Ser Asn Tyr Leu Asn Irp Tyr 175 185	624
ggt toc act ggt gac gag gcc cag ccg gcc agg cgc cgt acg Gly Ser Thr Gly Asp Alo Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr -5 -1 1 5	96 8 4	cag cag asa cca ggg asa gct cct asg ctc ctg atc tst tat aca eat Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Asn 190 190	672
aag ett ggt acc gag ete gga tee eee ggg etg eag gaa tte gag gtg Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Sar Pro Gly Leu Gln Glu Phe Glu Val 20	8 1	mam tig gom gmt ggm gto com tom agg tto mgt ggo mgt ggt tot ggg Lys Leu Alm Amp Gly Val Pro Ser Arg Phe Sor Gly Ser Gly Ser Gly 205 215	720
cgg cit cig gag ict ggt gga gga tia gig-aag cci gag ggg ica cig Arg Lou Lou Glu Ser Gly Gly Gly Lou Val Lya Pro Glu Gly Sar Lou 30 40	g 192 u	aga gat tot tot act atc ago ago otg gaa toc gaa gat att gga Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gly 220 230 235 235 235 235	768
asa ctc tcc tgt gtg gcc tct gga ttc acc ttc agt gac tat ttc atg Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Net 45	g 240 t	tet tat tac tgt can ong tat tat anc tat ccg tgg acg ttc gga cct Sar fyr fyr Cys Gla Gla fyr fyr Asn fyr Pro frp fhr Phe Gly Pro 240 245	816
ago tgg gto ogo cag got coa ggg aag ggg otg gag tgg gtt got ooc Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala His 60 70 70 75	s 288	gge acc asg ctg gas atc ass ggt ggs ggc ggt tea age gga ggt ggc Gly Thr Lys Lau Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly 255 265	864

19/24

18/24

1	ς
	2
į	Ξ
3	€
	Ξ
:	9
٠	-

aat Asn	Pho	eaa Lys	gag Glu	88c Gly 380	Ter Su	gco Ala	aaa Lys	BBB	ttc Pha 300	ttg gjj	Ser
888 Lys 445	cat His	atc Ile	Leu	Cln	Ala 365	aag Lys	tat Tyr	Gly		gtg Val 285	ggc Gly
Arg	can Gln 430	Thr BCC	I R	Gly	ntg Not	850 Asa 350	gct Ala	Ctg Lou	tto	Cln	88t Gly 270
P 66	Arg	tgc Cys 415	cag	Pr acc	tac Tyr	Lou	Asp 335	gag Glu	Ser	Pro	age Gly
Ser	tca Ser	Ser	Pro 400	Met	tac Tyr	Lou	gct	teg Ser 320	Cly	88a Gly	Ega Cly
C1y	Asp	888 Gly	7 6	gtc Val 385	Cys	Pb tt	gtg Val	gtc Val	Tyr 305	Lys	Ser
ntc Ile	cag Gla	Asp	tca	<b>₽</b> 66	8cn Ala 370	cta Lou	aaa Lys	gca Ala	ggc Cly	Ser 290	115 Beg
Pro	435 <del>1</del> 88	caa Cln	gca Ala	gtc Val	aga Arg	Cln 355	ggc Gly	Tyr	atg Wot	ctg Leu	gtg Val 275
Glu	IIe	ttg Leu 420	Ser	Ser	Phe	Het B	cgg Arg 340	att Ile	His	Lys	cag Gln
aga Arg	ttg Leu	Pro	gtc Val 405	Ser	8ac ∧sp	aac Asn	Phe Phe	act Thr 325	dr.	Lou	Leu Sto
atc Ile	Cla	BAAA Lys	Aso	014 014 0390	j e	att 11e	문	agt Ser	gtc Val 310	Ser	gtg Vol
Ser 455	gtg Val	착ᄩ	gta Val	gga Cly	gac Asp 375	רפת כלכ	gtc Val	agt Ser	Arg	tgt Cys 295	gag Glu
ESE Gly	nta Ile 440	Phe	gga Cly	Gly	aaa Lys	nag Lys 360	Ser	Ser	cag Cln	gag Clu	Ser 280
Ser	tet Tyr	8св Alв 425	gag Clu	agt Cly	aet Asn	Ser	Arg 345	att Ile	gct Ala	gcc Ala	688 Cly
Ser	get Asp	gat Asp	A Det	Ser	Tyr	Clu Seg	gac Asp	aat Asn 330	Pro	Ser	gga Cly
Ser	gat Asp	dei Br	yal val	Tyr 395	tgg gg	gac Asp	est Asn	atc Ile	888 Gly 315	ggs Cly	gge Gly
1440	1392	1344	1296	1248	1200	1152	1104	1056	1008	960	912

20/24

WO 03/011911

PCT/JP02/07735

1488

gac cat cat cat cat cat tga Asp His His His His His His 525 530 ggg ccc gas cas ass ctc atc tcs gas gag gat ctg ast agc gcc gtc Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Ass Ser Ala Val 510 520 tat git tit ggc agc gga acc cag cic acc git cia ggi cci cga gga Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Lau Gly Pro Arg Gly 495 500 505 ggt gac tat tac tgt ttc tca gga tat gtt gat agt gat ago aga ttg Gly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val Asp Ser Asp Ser Lys Leu 480 485 ggg aca aco gcc acc ttg acc atc aga gat gtc cgg gct gag gat gaa Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Yel Arg Ala Glu Asp Glu 460 465 470 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr -5 10 Wet Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  $-20 \ \ \, -15$ Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Pro Gly Leu Gln Glu Phe Glu Val  $$15\ \ \,$  25 <220> <223> Designed protein to act as the bispecific antibody Arg Leu Clu Sar Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Glu Gly Sar Leu  $30 \ \ 35$ **400**> 31 1536 1656 1632 1584

Lys Lau Ser Cys Val Ale Ser Cly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Met

WO 83/011911	PCT/JP02/07735	WO 03/011911 PCT/JP	PCT/JP02/07735
45 50 55		240 245 250	
Ser Trp Val Arg Cln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala His 60 76		Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly 265 269	
lle Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ser Gly Ser Vol 80		Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly 270 275 275	
Lys Cly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Ser Wet Val Tyr 100 105		Leu Val Gla Pro Gly Lys Ser Leu Lys Leu Sor Cys Glu Ala Ser Gly 285 295	
Leu Gln Wet Asn Asn Leu Azg Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Cys 110		Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Wet His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly 300 315	
Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp Phe Trp Gly Glo Gly 125		Arg Gly Leu Glu Ser Val Ale Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ile Asn Ile 320 320	
Thr Gin Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gin Wet 140 155		Lys Tyr Ala Asp Ala Vel Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn 335 340 345	
Thr Glo Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr 160 170		Ala Lys Asm Leu Leu Phe Leu Gin Wet Asm Ile Leu Lys Ser Glu Asp 360	
Ile Asn Cys Gln Ale Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr 175 186		Thr Ale Wet Tyr Cys Ale Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr Trp 375	
Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Lau Lau Ila Tyr Thr Asn 190 200		Gly Gln Gly Thr Wel Thr Wel Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Tyr 380 396 396	
Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly 205		Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val Gly Glu Thr Val 400 410	
Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Ile Gly 220 235 235		Lys Ile Thr Cys Ser Cly Asp Gin Leu Pro Lys Tyr Phe Als Asp Trp 420	
Ser fyr fyr Cys Gin Gin fyr fyr Asn fyr Pro Irp fhr Phe Gly Pro		Phe His Cln Arg Ser Asp Gln Thr lle Leu Gln Val lle Tyr Asp Asp	

22/24

23/24

WO US/NIT911 PCT/JPUZ/07735

430 435 440

Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser Gly Ser Ser Ser 445 450

Gly Thr Thr Ala Thr Lau Thr Ilo Arg Asp Val Arg Ala Glu Asp Glu 460 465 470

Gly Asp Tyr Tyr Cys Pho Ser Gly Tyr Val Asp Ser Asp Ser Lys Lau 480 485

Tyr Val Pho Cly Sor Cly Thr Cln Lou Thr Val Leu Cly Pro Arg Cly 495 500 505

Cly Pro Glu Gln Lys Lou Ilo Sor Glu Glu Asp Lou Asn Sor Ala Val 510 515 520

Asp his his his his his his 525 530

											o.	
Name and Jap	Date of the 26		m <sub>ef</sub> X	. >>	⊳	P,X	Category*	Electronic WPI	Minimum Int	According	ž Š	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	of the scrual completion of the international search 26 September, 2002 (26.09.02)	Spreak categories of ciried documents:  document defining he specared state of the sar which is not considered to be of particular relevance.  satiler document with may throw doubts on priority claim(s) or which is closed to establish the politication date of nonter claim(s) or which is closed to establish the politication date of nonter claim(s) or other special reason (as specifica) document referring to as oral disclosure, use, catabilition or other mates document published pairs to the international filing date but later than the priority date datanced	Further documents are listed in the continuation of Box C.	Freeman G. J. et al., Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation, J. Exp. Med., 2000, Vol.192, No.7, pages 1027 to 1034	JP 7-291996 A (Tasuku HONJO), 07 November, 1995 (07.11.95), Full text & EP 670369 A2 & US & US 5698520 A	OKAZAKI T. et al., PD-1 immunoreceptor cell receptor-mediated signaling by re homology 2-domain-containing tyrosine 2 to phosphotyrosine, Proc. Natl. Acad USA, 2001, Vol.98, No.24, pages 13866	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  Clatica of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	S),	Minimum donumensidos exarched (dassificacion system followed by classificacion symbols) Int.Cl <sup>2</sup> CO7K16/46, A61P31/02, A61P35/00, A61P37/ CO7K19/00, A61K38/00	According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	CLASSIMCATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl' COTK16/46, A61F31/02, A61F C07K19/00//A61K38/00	INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Authorized officer	Date of mailing of the international search report 08 October, 2002 (08.10.	I lutri docurant published after the international filing data or principly data and east of condition with the application our clotted on understand the principle or theory underlying the investation be considered forward or productive returnacy; the chimed investation cannot be considered to involve an inventive step when the document is better allows considered to involve as inventive step when the document is the chimed investion cannot be considered to involve as inventive step when the document is combined with one or come other each document, such combined with one or come other each document, such combination being obvious to a person abilited in the art of the document number of the same parent family	See patent family annex.	agement of the PD-1 by a novel B7 family regulation of lymphocyte 2000, Vol.192, No.7,	5629204 A	immunoreceptor inhibits B ignaling by recruiting src ning tyrosine phosphatase oc. Natl. Acad. Sci., pages 13866 to 13871	propriate, of the relevant passages	use extent was such documents are included anne of data base and, where practicable, seat MEDLINE (STN)	35/00, A61P37/00, A61P37/06	tional classification and IPC	A61P35/00, A61P37/00, A61P37/06	International application No. PCT/JP02/07
	earch report (08.10.02)	majonal fling date or application but cited to application but cited to thying the invention among he red to invention cannot be tall med invention cannot be tall med invention cannot be when the document is document, such stilled in the art samily		1-25	1-25	1-25	Relevant to claim No.	प्ते (स्ताड प्रदर्श)	37/06,		17/06,	lional application No. PCT/JP02/07735

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

24/24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP02/07735

TSSITWURA H. et el., Immunological studies on 1-25 P0-1 deficient mice: implication of Pp-1 as a sequilator for E call responses, int.  Immunol., 1998, Vol.10, No.10, Pages 1563 to 1572  Immunol., 1998, Vol.10, No.10, Pages 1563 to 1572	1_	Category* Catation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
		NISHIMURA H. et al., Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses, Int. Immunol., 1998, Vol.10, No.10, Pages 1563 to 1572	1-25
		•	
_			

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

	国務開查報告	国際出源市号 PCT/JP02/077	735
A. 発明の Int.	表明の属する分野の分類(国際等所分類(1PC)) ot. C.1. OTR16/46。A61731/02、A61785/00。	(FPC) ) Abital/O2, Abitas/O0, Abita3/O0, Abita3/O6, Cotris/O0 // Abik 38/O0	٥
B. 開査を 関連を行った Int.	B. <b>原在を行った分野 開産を行った泉小段賢科(国際本作分類(IPC))</b> Int. Cl. **の7KI6/46, AGiP31/02, AGIP35/00,	(IPC)) Agipa1/02, Agipa5/00, Agipa7/00, Agipa7/06, COTL19/00, Agik 38/00	
是小园贷料以	最小限数科以外の数料で調査を行った分野に合きれるもの		
回数数本で使用した WPI/B MEDLI	した電子データベース (データベー/ / / / / / / / / / / / / / / / / / /	スの名味、間査に使用した旧語) , J   GST(JOIS)	
C. 阻塞十	ると認められる文教		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、	その関連する箇所の表示	図道ナる 語次の範囲の参与
×	Okazaki T. et al., PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by rocruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, Vol No. 24, pages 13866-13871	reptor inhibits B cell 1-25 cruiting src homology phatase 2 to L Sci. USA, 2001, Vol.98,	LC)
A	JP 7-291996 A (本庶佑) 1995.11.07, & EP 670369 A2 & US 5629204 A & US 6698520 A	, 全文	10
区間の統領	C相の使きたも文献が列挙されている。	□ ペテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文数の (A) 体に図込 もの (B) 国際出程 (E) 国際出程 (L) 経済・ (L) 経済・ (E) 日第一(C) 工程(C) 口頭に「	・ 引用文献のカテゴリー (A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す もの もの (E) 国際出頭目前の出頭または特許であるが、国際出頭目 以後に公義されたもの 日常しく状態の特別を理由を確立するために引用する 文献(理由を付す) 文献(理由を付す) (O) 口頭による服示、使用、展示等に言及する文献 (P) 国際出題目前で、かつ優先将の主題の基礎となる出顧	<ul> <li>□ 1 国際出席日文法された文献</li> <li>□ 1 国際出席日文は億名日様に公表された文献であって</li> <li>□ 1 日原出席日本ものではなく、毎時の原理文は理治の国籍のために引用するもの</li> <li>□ 1 時に関連のある大阪であって、当該大阪のみで海明の新校性又は進歩性がないと考えられるもの</li> <li>□ 1 時に関連の多く文体であって、当該大阪のみで海明の新校性とびは参摩性がないと考えられるもの</li> <li>□ 2 人間をひ、当業者にとって自労であるの目はよりによって自労である。</li> <li>□ 2 人間をは、とのて自労である部合せによって追求した。当業者にとって自労である部合せによって追求した。当業者にとって自労である額合せによって追求性がないと考えられるもの</li> <li>□ 1 人間を表して当まる。</li> </ul>	は
国際調査を売了した日	JUた目 26.09.02 .	国際開產報告の発送R (18.10.02)	
国際調査機関の 日本日 東大克	国際調查機関の名称及びあて先 日本国体符庁(1SA/1P) 解優格号100-8915 東京都千代田区農が四三丁目4巻3号	#所庁春査日 (相関のある現園) (元) 4N (組制) (日) (日) (日) (日) (日) (日) (日) (日) (日) (日	3488

株式PCT/1SA/210 (第2ページ) (1998年7月)

>	አንፈካ−* A	C (接聲)
Nishimura H. et al., Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses, Int. Immunol., 1998, Vol. 10, No. 10, pages 1563-1572	9月末改法 及以一無の包別は販達すると申は、その興選する解房の起来 Freeman G. J. et al., Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation, J. Exp. Med., 2000, Vol.192, No.7, pages 1027-1034	超過すると思わられる文献
1-25	開来の範囲の番号 1~25	200

This Page Blank (Lspie)

## This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

#### **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

□ BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
□ FADED TEXT OR DRAWING
□ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
□ SKEWED/SLANTED IMAGES
□ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
□ GRAY SCALE DOCUMENTS
□ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
□ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
□ OTHER:

#### IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspfo)